

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E BIOQUÍMICA



**Desenvolvimento de um Método Analítico Utilizando a Técnica
de Microextração Adsorptiva em Barra (BA μ E) para a
Determinação de Antidepressivos Tricíclicos em Matrizes
Biológicas**

Mariana Neto de Oliveira

Mestrado em Química
Especialização em Química

Dissertação orientada por:
Professor Doutor José Manuel Florêncio Nogueira
Doutor Nuno da Rosa Neng

Dedicatória e agradecimentos

Em primeiro lugar gostaria de agradecer aos meus orientadores, Professor Doutor José Manuel Florêncio Nogueira e Doutor Nuno da Rosa Neng por me proporcionarem a oportunidade de desenvolver este trabalho com o seu apoio.

Ao Professor Doutor José Manuel Florêncio Nogueira, pela oportunidade de integrar o seu grupo de investigação, pelos conselhos, encorajamento e disponibilidade.

Ao Doutor Nuno da Rosa Neng, pelos conhecimentos científicos transmitidos, pela grande disponibilidade para discutir ideias e responder às minhas muitas dúvidas, pelo bom ambiente de trabalho e ainda pelo apoio nos muitos ensaios repetidos.

Ao Doutorando Samir Ahmad, pela infindável disponibilidade para me guiar no laboratório, pela paciência para responder a todas as minhas perguntas (até àquelas que não faziam sentido), pela boa disposição e apoio constante imprescindível para a conclusão deste trabalho.

A todos os colegas de laboratório que tive este ano pelo bom ambiente no laboratório, pela partilha de opiniões e companheirismo.

A todos os amigos que passaram pela minha vida académica e que a marcaram de forma especial. Ao Bruno Gomes, Rúben Torres e Raquel Freire por tornarem momentos aborrecidos divertidos. Aos companheiros do D.I. por estarem sempre prontos a jogar às cartas. Ao Pedro Andrade pela amizade e por achar as minhas piadas hilariantes.

À Daisy, pela amizade de longa data e por estar sempre pronta (naquelas raras coincidências) a partilhar novidades enquanto estamos na elíptica.

Às melhores amigas que esta faculdade me deu, Filipa Rodrigues, Margarida Pereira e Rita Sales, por há seis anos terem achado que eu até devia ser simpática e não terem feito planos para fugirem de mim, pelas muitas tardes “perdidas” na faculdade, por estarem presentes nos piores e nos melhores momentos e pelo “sofrimento” partilhado nesta etapa. Começámos juntas e acabamos juntas.

Ao Nuno Rodrigues, por ser especial, por todo o carinho, apoio e paciência para me aturar, por acreditar sempre em mim, pelas muitas aventuras e ainda por estar sempre disponível para derretermos com animais adoráveis. Agora e sempre.

À minha família, em especial aos meus pais, pelo apoio incondicional mesmo quando o pânico se instalava e por me darem sempre liberdade para escolher o meu próprio caminho.

Obrigada.

Comunicações em poster

- M.N. Oliveira*, S.M. Ahmad, N.R. Neng, J.M.F. Nogueira., “*Development of an Analytical Method for the Determination of 6 Tricyclic Antidepressants in Biological Matrices*”, CQE Days, Academia das Ciências – Lisboa – Portugal, 30 e 31 de Maio 2019.
- M.N. Oliveira*, S.M. Ahmad, N.R. Neng, J.M.F. Nogueira., “*Applying Bar Adsorptive Microextraction (BA μ E) for the Determination of Tricyclic Antidepressants*”, 4ª edição do Colégio da Química da Universidade de Lisboa, Reitoria da Universidade de Lisboa – Lisboa – Portugal, 16 a 18 de Julho 2019.
- M.N. Oliveira*, S.M. Ahmad, N.R. Neng, J.M.F. Nogueira., “*Determination of Tricyclic Antidepressants in Biological Matrices by Bar Adsorptive Microextraction (BA μ E)*”, XVII Latin American Symposium on Chromatography and Related Techniques (COLACRO XVII), Universidade Tiradentes – Aracaju – Brasil, 14 a 19 de Julho 2019.

Resumo

A depressão é uma doença mental comum e uma das maiores causas de incapacidade a nível mundial. Estima-se que afete cerca de 300 milhões de pessoas em todo o mundo, sendo que o consumo de antidepressivos tem vindo a aumentar, incluindo em Portugal. Os antidepressivos permitem que pessoas com depressão consigam viver vidas praticamente normais, sem quaisquer restrições. Os antidepressivos tricíclicos (TCAs), em particular, foram os primeiros a serem comercializados (1955) e ainda hoje são bastante prescritos. Contudo os antidepressivos, especialmente os clássicos, podem causar intoxicações graves se tomados em quantidades superiores às recomendadas, sendo que os TCAs possuem uma estreita gama terapêutica. A determinação dos níveis de TCAs é necessária para triagens toxicológicas de emergência, testes de drogas de abuso e exames forenses para fatalidades com probabilidade de terem sido causadas por *overdoses* de TCAs. Assim, é essencial desenvolver métodos com elevada sensibilidade, precisão, simplicidade e de fácil uso que permitam a determinação destes compostos em amostras biológicas (*ex. urina*).

O presente trabalho consistiu no desenvolvimento, otimização, validação e aplicação de um método analítico alternativo, alicerçado na tecnologia de amostragem por flutuação, para a determinação de seis antidepressivos tricíclicos (amitriptilina, mianserina, trimipramina, imipramina, mirtazapina e dosulepina) em matrizes de urina. Para tal, recorreu-se à técnica de microextração adsorbtiva em barra seguida de microdessorção líquida e análise por cromatografia em fase gasosa com injeção de grandes volumes acoplada à espetrometria de massa operando no modo de monitorização de iões selecionados (BA μ E- μ LD/LVI-GC-MS(SIM)).

Para otimização da metodologia desenvolvida, foram efetuados diversos estudos, sendo que o polímero octadecil Supelclean ENVI-18 (C18) demonstrou maior eficiência comparativamente às outras nove fases sorventes testadas. Em condições experimentais otimizadas (microextração: 16 h (990 rpm), pH 12, 5 % NaCl; retroextração: MeOH:ACN (50:50, v:v, volume), 30 min, sob tratamento ultrassónico) foi possível obter recuperações médias compreendidas entre 80,5 % e 99,6 %. Os limites de deteção situam-se entre 0,2 e 1,6 μ g/L e, os de quantificação, em 10 μ g/L. Verificou-se uma distribuição heterocedástica dos resíduos, pelo que foi realizada uma regressão linear ponderada para cada um dos analitos, tendo-se aplicado um fator de ponderação de $1/y$. A gama de trabalho escolhida foi entre 10,0 e 1000,0 μ g/L, contendo uma excelente linearidade ($r^2 > 0,9960$). O efeito de matriz variou entre 90,2 % e 112,9 % (RSD < 13,9 %). Foi igualmente possível obter elevadas recuperações (92,3 % a 111,5 %; RSD < 12,26 %) e uma elevada eficiência do processo analítico (84,9 % a 124,3 %; RSD < 13,9 %).

O método desenvolvido foi posteriormente aplicado a 52 amostras anónimas fornecidas por uma clínica de análises. Foi possível determinar a presença de amitriptilina numa das amostras ($158,9 \pm 1,9$ μ g/L), confirmada pelo tempo de retenção e espectro de massa.

A metodologia proposta revelou ser uma estratégia alternativa para a análise de TCAs em matrizes de urina, apresentando como principais vantagens a utilização de pequenas quantidades de amostra e de solvente, fácil manipulação, simplicidade e excelente desempenho analítico.

Palavras-chave

Antidepressivos tricíclicos

Microextração adsorptiva em barra (BA μ E)

Tecnologia de amostragem por flutuação

Cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massa

Urina

Abstract

Depression is a common mental disease and one of the biggest causes for incapacity around the globe. It is estimated to affect around 300 million patients worldwide, the number of antidepressants consumed has been increasing, as it has in Portugal. Antidepressants allow people diagnosed with depression to live almost ordinary lives, with no restrictions. Tricyclic antidepressants (TCAs) were the first antidepressants to be commercialized (1955) and are still to this day in large use. However, antidepressants, especially classic ones, can cause serious intoxications if used in higher quantities than prescribed, it is also worth noting that TCAs have a narrow therapeutic range. The determination of TCAs levels is necessary for emergency toxicological screenings, abuse drugs tests and forensic exams for fatalities likely to have been caused by TCA overdose. For this reason, it is crucial that methods with high sensibility, precision, simplicity and user-friendly for the determination of these compounds in biological samples (*e.g.*, urine) be developed.

This work entailed the development, optimization, validation and application of an analytical method, based on floating sampling technology, for the determination of six tricyclic antidepressants (amitriptyline, mianserin, trimipramine, imipramine, mirtazapine and dosulepin) in urine matrices. For this, we used bar adsorptive microextraction followed by liquid microdesorption and analysis by gas chromatography with large volume injection coupled with mass spectrometry operating in selected ion monitoring (BA μ E- μ LD/LVI-GC-MS(SIM)).

For the optimization of the developed methodology, several studies were made, the polymer octadecyl Supelclean ENVI-18 (C18) showed better efficiency comparatively to the other nine sorbent phases studied. In optimized experimental conditions (microextraction: 16 h (990 rpm), pH 12.0, 5 % NaCl; retroextraction: MeOH:CAN (50:50, v:v, volume), 30 min under ultrasonic treatment) average recuperation yields obtained varied between 80.5 and 99.6 %. Detection limits are located between 0.2 and 1.6 μ g/L and, the quantification limit, was 10.0 μ g/L. A heteroscedastic distribution of residues was found, whereby a weighted linear regression was performed for each of the analytes, a weighting factor of $1/y$ was applied. The selected working range was between 10.0 and 1000.0 μ g/L, showing remarkable linearity ($r^2 > 0.9960$). The matrix effect ranged from 90.2 % to 112.9 % (RSD <13.9 %), high recuperation yields were obtained (92.3 % to 111.5 %; RSD <12.26 %) and a remarkable efficiency of the analytical process (84.9 % to 124.3 %; RSD <13.9 %).

The developed methodology was then applied to 52 anonymous samples obtained from a medical clinic. One sample showed the presence of amitriptyline (158.9 ± 1.9 μ g/L), confirmed by retention time and mass spectrum.

The proposed methodology proved to be an alternative strategy for the analysis of TCAs in urine matrices, having as main advantages the use of small amounts of sample and solvent, easy manipulation, simplicity and excellent analytical performance.

Keywords

Tricyclic antidepressants

Bar adsorptive microextraction (BA μ E)

Flotation sampling technology

Gas chromatography coupled to mass spectrometry

Urine

Índice

Índice	XV
Índice de tabelas	XVIII
Índice de figuras	XVIII
Lista de abreviaturas, siglas e símbolos.....	XXIII
1. Introdução.....	1
1.1. Depressão e antidepressivos	1
1.1.1. Antidepressivos tricíclicos.....	2
1.1.1.1. Farmacocinética dos antidepressivos em estudo.....	3
1.2. Monitorização de antidepressivos tricíclicos.....	5
1.3. Metodologias analíticas para a análise de TCAs	7
1.4. Técnicas de preparação de amostras.....	7
1.5. Extração sortiva em barra de agitação (SBSE).....	9
1.6. Técnicas de microextração adsortiva.....	10
1.6.1. Princípios e vantagens	11
1.6.2. Desenvolvimento do método com A μ E.....	12
1.7. Cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massa.....	13
1.7.1. Métodos de quantificação	14
2. Objetivos	17
3. Parte experimental	19
3.1. Reagentes químicos, materiais sorventes e amostras	19
3.2. Material e equipamento	20
3.3. Método experimental.....	21
3.3.1. Preparação das soluções padrão	21
3.3.2. Condições instrumentais.....	21
3.3.3. Calibração instrumental.....	22
3.3.4. Preparação dos dispositivos BA μ E.....	22
3.3.5. Ensaio de otimização	23
3.3.6. Validação do método e análise de amostras reais.....	24
4. Discussão de Resultados.....	27
4.1. Otimização das condições instrumentais.....	29
4.1.1. Calibração instrumental	30
4.2. Seleção do material Sorvente para BA μ E	30
4.3. Processo de otimização.....	34

4.3.1.	Otimização da retroextração	34
4.3.1.1.	Efeito do tipo de solvente	34
4.3.1.2.	Efeito do tempo de retroextração.....	35
4.3.2.	Otimização da microextração	37
4.3.2.1.	Efeito da velocidade de agitação	37
4.3.2.2.	Efeito do pH	39
4.3.2.3.	Efeito do modificador orgânico	40
4.3.2.4.	Efeito da força iônica.....	41
4.3.2.5.	Efeito do tempo de equilíbrio	42
4.3.2.6.	Efeito do volume de amostra	43
4.3.2.7.	Efeito do tipo de suporte do dispositivo BAμE	44
4.4.	Condições experimentais otimizadas.....	47
4.5.	Validação do método.....	47
4.5.1.	Calibração em amostras de urina	47
4.5.1.1.	Limites analíticos e gama dinâmica de trabalho/linearidade	48
4.5.1.2.	Exatidão e precisão	50
4.5.1.3.	Efeitos de matriz, recuperações médias e eficiência do processo.....	51
4.6.	Aplicação a amostras reais	52
4.7.	Comparação com estudos anteriores	55
5.	Conclusão e Perspectivas Futuras	59
6.	Referências Bibliográficas.....	61
I.	Anexo 1	i
i.	Cromatografia.....	i
ii.	Cromatografia gasosa	ii
a.	Injetores para amostras líquidas	iii
b.	Colunas	iii
iii.	Interface GC-MS	iv
iv.	Espectrometria de massa	iv
a.	Sistema de vácuo	v
b.	Tipos de ionização.....	v
c.	Tipos de analisador m/z.....	vi
d.	Deteção de iões.....	vi
e.	Aquisição de dados.....	vii
II.	Anexo 2	ix
III.	Anexo 3	xi
i.	Espectros de massa dos compostos estudados obtidos.....	xi

a.	Espetro de massa da amitriptilina.....	xi
b.	Espetro de massa da mianserina	xi
c.	Espetro de massa da trimipramina.....	xii
d.	Espetro de massa da imipramina	xii
e.	Espetro de massa da mirtizapina	xiii
f.	Espetro de massa da dosulepina	xiii
IV.	Anexo 4	xv
i.	Especiação dos compostos em função do pH obtidos pelo programa MarvinView.....	xv
a.	Cloridrato de amitriptilina	xv
b.	Cloridrato de mianserina	xvi
c.	Trimipramina.....	xvii
d.	Cloridrato de Imipramina	xviii
e.	Mirtazapina.....	xix
f.	Cloridrato de Dosulepina.....	xx
V.	Anexo 5	xxi
VI.	Anexo 6	xxiii
i.	Curvas de calibração ponderadas em urina	xxiii
a.	Curva de calibração para a amitriptilina.....	xxiii
b.	Curva de calibração para a mianserina	xxiii
c.	Curva de calibração para a trimipramina.....	xxiv
d.	Curva de calibração para a imipramina	xxiv
e.	Curva de calibração para a mirtizapina	xxv
f.	Curva de calibração para a dosulepina	xxv
VII.	Anexo 7	xxvii

Índice de tabelas

Tabela 1.1 - Indicações para o uso de diversos antidepressivos [2].	3
Tabela 1.2 - Informações sobre a farmacocinética para cada composto analisado.	4
Tabela 1.3 - Níveis terapêuticos de concentração em urina, plasma e soro dos TCAs estudados.	6
Tabela 3.1 - Dosagem de cada comprimido e respetiva concentração da solução padrão mãe.	21
Tabela 4.1 - Propriedades físicas e químicas dos TCAs selecionados para o trabalho.	28
Tabela 4.2 - Iões selecionados no modo SIM para cada TCA. Iões alvo assinalados a negrito. Picos base assinalados com *.	29
Tabela 4.3 - Condições otimizadas para o método desenvolvido.	47
Tabela 4.4 - Recuperações médias dos analitos nas condições otimizadas do método desenvolvido.	47
Tabela 4.5 - Resultados obtidos para o LOD aquando da validação no método em urina.	48
Tabela 4.6 - Valores do F tabelado e do F calculado para os diversos compostos em análise.	49
Tabela 4.7 - Parâmetros de regressão relativos à gama dinâmica de trabalho para a presente metodologia.	50
Tabela 4.8 - Valores de exatidão e precisão para os vários níveis de fortificação escolhidos (LLOQ-10,0 µg/L Baixo-50,0 µg/L Médio-500 µg/L Alto-1000 µg/L), tanto para o estudo intra-dia como para os estudos inter-dias.	51
Tabela 4.9 - Efeito de matriz, recuperações médias e eficiência do processo para os níveis de fortificação escolhidos.	52
Tabela 4.10 - Resultado da análise em modo SIM com o método proposto das amostras anónimas.	52
Tabela 4.11 - Comparação da recuperação, RSD, LOD, LOQ, gama linear e r^2 de diversos estudos com o trabalho presente.	56

Índice de figuras

Figura 1.1 - Estrutura da clorpromazina.	2
Figura 1.2 – a: Esquema representativo da técnica SPME em modo headspace [40]; b: Esquema representativo do dispositivo utilizado em SBSE. Adaptado de [38].	8
Figura 1.3 - Representação esquemática e imagem dos dispositivos utilizados em técnicas de microextração adsortiva, para BAµE (a), e MSAµE (b). Adaptado de [38].	10
Figura 1.4 - Representação esquemática do processo de extração para os dispositivos BAµE (1 – Frasco de Amostragem; 2 – Vórtice; 3 – Amostra; 4 – µ-dispositivo em barra; 5 – Barra de agitação de Teflon).	12
Figura 1.5 - Representação Esquemática de um GC-MS simples. Adaptado de [51].	13
Figura 3.1 - Representação esquemática do procedimento experimental para a otimização incluindo, a extração, posterior retroextração, seguida de análise.	23
Figura 4.1 - Estruturas dos Antidepressivos em estudo. a: Cloridrato de amitriptilina, b: Cloridrato de mianserina, c: Trimipramina, d: Imipramina, e: Mirtazapina, f: Cloridrato de dosulepina.	27

Figura 4.2 - Estrutura da difenilamina.....	28
Figura 4.3 - Cromatograma obtido por LVI-GC-MS(SIM) relativo aos antidepressivos estudados em condições instrumentais otimizadas. (PI 1000 µg/L; TCAs 600 µg/L) (1- AMT; 2- MIA; 3- TRI; 4- IMP; 5- MIR; 6-DOT).....	29
Figura 4.4 - Efeito da seletividade dos ACs para o enriquecimento dos TCAs em estudo em água ultrapura, obtido por BAµE-µLD/LVI-GC-MS(SIM). Condições do ensaio: 5 mL de água ultrapura fortificada com 100 µL de solução mistura de TCA com concentração de 500,0 µg/L; microextração 3 h (990 rpm), pH 5,5; retroextração: 90 µL de MeOH, 30 min sob tratamento ultrassônico.	31
Figura 4.5 - Quantidade de TCAs que permanecem em solução após microextração usando diferentes ACs como fase sorventes. Condições do ensaio: 5 mL de água ultrapura fortificada com 25 µL de solução mistura de TCA com concentração de 100 mg/L; microextração 16h (990 rpm), pH 5,5; análise realizada por LVI-GC-MS(SIM).	32
Figura 4.6 - Efeito da seletividade dos polímeros para o enriquecimento dos TCAs em estudo em água ultrapura, obtido por BAµE-µLD/LVI-GC-MS(SIM). Condições do ensaio: 5 mL de água ultrapura fortificada com 100 µL de solução mistura de TCA com concentração de 500,0 µg/L; extração 3h (990 rpm), pH 5,5; retroextração: MeOH, 30 min sob tratamento ultrassônico.	33
Figura 4.7 - Estruturas dos polímeros utilizados como fase sorvente.	33
Figura 4.8 – a: Efeito do solvente para a LD no enriquecimento dos TCAs em estudo em água ultrapura, obtido por BAµE-µLD/LVI-GC-MS(SIM). a: ACN; b: MeOH:ACN. Condições do ensaio: 5 mL de água ultrapura fortificada com 100 µL de solução mistura de TCA com concentração de 500,0 µg/L; microextração 3 h (990 rpm), pH 5,5; retroextração: 90 µL de ACN ou MeOH:ACN (50:50, v:v), 30 min sob tratamento ultrassônico.....	35
Figura 4.9 - Efeito do tempo de retroextração no enriquecimento dos TCAs em estudo em água ultrapura, obtido por BAµE-µLD/LVI-GC-MS(SIM). a: SX; b: C18; c: Strata CN. Condições do ensaio: 5 mL de água ultrapura fortificada com 100 µL de solução mistura de TCA com concentração de 500,0 µg/L; microextração 3 h (990 rpm), pH 5,5; retroextração: 90 µL de MeOH:ACN (50:50, v:v), 15/30/45 min sob tratamento ultrassônico.....	37
Figura 4.10 - Efeito da velocidade de agitação no enriquecimento dos TCAs em estudo em água ultrapura, obtido por BAµE-µLD/LVI-GC-MS(SIM). a: SX; b: C18. Condições do ensaio: 5 mL de água ultrapura fortificada com 100 µL de solução mistura de TCA com concentração de 500,0 µg/L; microextração 3h (750/990/1250 rpm), pH 5,5; retroextração: 90 µL de MeOH:ACN (50:50, v:v), 30 min sob tratamento ultrassônico.....	38
Figura 4.11 - Efeito do pH no enriquecimento dos TCAs em estudo em água ultrapura, obtido por BAµE-µLD/LVI-GC-MS(SIM). a: SX; b: C18. Condições do ensaio: 5 mL de água ultrapura fortificada com 100 µL de solução mistura de TCA com concentração de 500,0 µg/L; microextração 3 h (990 rpm), pH 2,0/5,5/8,0/12,0; retroextração: 90 µL de MeOH:ACN (50:50, v:v), 30 min sob tratamento ultrassônico.	40
Figura 4.12 - Efeito da seletividade do modificador orgânico no enriquecimento dos TCAs em estudo em água ultrapura, obtido por BAµE(C18)-µLD/LVI-GC-MS(SIM). Condições do ensaio: 5 mL de água ultrapura (com 0/5/10/15/20% de MeOH) fortificada com 100 µL de solução mistura de TCA com concentração de 500,0 µg/L; microextração 3 h (990 rpm), pH 12,0; retroextração: 90 µL de MeOH:ACN (50:50, v:v), 30 min sob tratamento ultrassônico.	41

Figura 4.13 - Efeito da força iônica para o enriquecimento dos TCAs em estudo em água ultrapura, obtido por BAμE(C18)-μLD/LVI-GC-MS(SIM). Condições do ensaio: 5 mL de água ultrapura (com 0/5/10/15/20% de NaCl) fortificada com 100 μL de solução mistura de TCA com concentração de 500,0 μg/L; microextração 3 h (990 rpm), pH 12,0; retroextração: 90 μL de MeOH:ACN (50:50, v:v), 30 min sob tratamento ultrassônico.....	42
Figura 4.14 - Efeito do tempo de equilíbrio para o enriquecimento dos TCAs em estudo em água ultrapura, obtido por BAμE(C18)-μLD/LVI-GC-MS(SIM). Condições do ensaio: 5 mL de água ultrapura (com 5% de NaCl) fortificada com 100 μL de solução mistura de TCA com concentração de 500,0 μg/L; microextração 1/2/3/5/16 h (990 rpm), pH 12,0; retroextração: 90 μL de MeOH:ACN (50:50, v:v), 30 min sob tratamento ultrassônico.....	43
Figura 4.15 - Efeito do volume da amostra no enriquecimento dos TCAs em estudo em água ultrapura, obtido por BAμE(C18)-μLD/LVI-GC-MS(SIM). Condições do ensaio: 1,5/5,0/10,0/25,0/40,0 mL de água ultrapura (com 5% de NaCl) fortificada com 100 μL de solução mistura de TCA com concentração de 500 μg/L; microextração 16 h (990 rpm), pH 12,0; retroextração: 90 μL de MeOH:ACN (50:50, v:v), 30 min sob tratamento ultrassônico.....	44
Figura 4.16 - Procedimento experimental proposto no novo ciclo BAμE [79].....	45
Figura 4.17 - Efeito do tipo de suporte do dispositivo BAμE para o enriquecimento dos TCAs em estudo em água ultrapura, obtido por BAμE(C18)-μLD/LVI-GC-MS(SIM). Condições do ensaio: 5,0 mL de água ultrapura (com 5% de NaCl) fortificada com 100 μL de solução mistura de TCA com concentração de 500 μg/L; microextração 16 h (990 rpm), pH 12,0; retroextração: 90 μL de MeOH:ACN (50:50, v:v), 30 min sob tratamento ultrassônico.....	46
Figura 4.18 – a: Cromatograma obtido da análise de uma amostra desconhecida realizado de acordo com o método otimizado BAμE(C18)-μLD/LVI-GC-MS(SIM); b: Cromatograma obtido da análise de uma amostra de urina fortificada (0,1 μg/L), realizado de acordo com o método otimizado BAμE(C18)-μLD/LVI-GC-MS(SIM). (1-AMT 2-MIA 3-TRI 4-IMP 5-MIR 6-DOT).	53
Figura 4.19 - Espetro de massa obtido da amostra desconhecida para confirmação da presença de AMT.	54
Figura 4.20 - Espetro de massa característico obtido para a amitriptilina após a análise do padrão.	54
Figura I.1 - Representação esquemática de um analisador de m/z do tipo quadrupólo [51].	vi
Figura III.1 - Espetro de massa característico da amitriptilina.....	xi
Figura III.2 - Espetro de massa característico da mianserina.	xi
Figura III.3 - Espetro de massa característico da trimipramina.....	xii
Figura III.4 - Espetro de massa característico da imipramina.	xii
Figura III.5 - Espetro de massa característico da mirtazapina.....	xiii
Figura III.6 - Espetro de massa característico da dosulepina.	xiii
Figura IV.1 -Possível forma de ionização da AMI. Espécie 1.	xv
Figura IV.2 - Possível forma de ionização da AMI. Espécie 2.	xv
Figura IV.3 - Proporção das espécies neutras e ionizadas de AMI em função do pH.....	xv
Figura IV.4 - Possível forma de ionização da MIA. Espécie 1.	xvi
Figura IV.5 - Possível forma de ionização da MIA. Espécie 2.	xvi
Figura IV.6 - Possível forma de ionização da MIA. Espécie 3.	xvi
Figura IV.7 - Proporção das espécies neutras e ionizadas de MIA em função do pH.....	xvi

Figura IV.8 - Possível forma de ionização da TRI. Espécie 1.	xvii
Figura IV.9 - Possível forma de ionização da TRI. Espécie 2.	xvii
Figura IV.10 - Possível forma de ionização da TRI. Espécie 3.....	xvii
Figura IV.11 - Proporção das espécies neutras e ionizadas de TRI em função do pH.	xvii
Figura IV.12 - Possível forma de ionização da IMP. Espécie 1	xviii
Figura IV.13 - Possível forma de ionização da IMP. Espécie 2.....	xviii
Figura IV.14 - Possível forma de ionização da IMP. Espécie 3.....	xviii
Figura IV.15 - Proporção das espécies neutras e ionizadas de IMP em função do pH.	xviii
Figura IV.16 - Possível forma de ionização da MIR. Espécie 1.	xix
Figura IV.17 - Possível forma de ionização da MIR. Espécie 2.	xix
Figura IV.18 - Possível forma de ionização da MIR. Espécie 3.	xix
Figura IV.19 - Possível forma de ionização da MIR. Espécie 4.	xix
Figura IV.20 - Proporção das espécies neutras e ionizadas de MIR em função do pH.....	xix
Figura IV.21 - Possível forma de ionização da DOT. Espécie 1.....	xx
Figura IV.22 - Possível forma de ionização da DOT. Espécie 2.....	xx
Figura IV.23 - Proporção das espécies neutras e ionizadas de DOT em função do pH.	xx
Figura VI.1 - Curva de calibração em urina para a AMT obtida pelo método de adição padrão.....	xxiii
Figura VI.2 - Curva de calibração em urina para a MIA obtida pelo método de adição padrão.....	xxiii
Figura VI.3 - Curva de calibração em urina para a TRI obtida pelo método de adição padrão.....	xxiv
Figura VI.4 - Curva de calibração em urina para a IMP obtida pelo método de adição padrão.....	xxiv
Figura VI.5 - Curva de calibração em urina para a MIR obtida pelo método de adição padrão.....	xxv
Figura VI.6 - Curva de calibração em urina para a DOT obtida pelo método de adição padrão.....	xxv

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos

°C	Graus Celsius
AALLME	Microextração líquido-líquido assistida por ar (do inglês <i>air-agitated or air-assistided liquid-liquid microextraction</i>)
AC	Carvão ativado (do inglês <i>activated carbon</i>)
ac	Corrente alternada (do inglês <i>alternating current</i>)
ACN	Acetonitrilo
AMT	Amitriptilina
APCI	Ionização química à pressão atmosférica (do inglês <i>atmospheric pressure chemical ionization</i>)
AμE	Microextração adsortiva (do inglês <i>adsorptive microextraction</i>)
BAμE	Microextração em barra adsortiva (do inglês, <i>bar adsorptive microextraction</i>)
CE	Eletroforese Capilar (do inglês <i>capillary electrophoresis</i>)
CI	Ionização química (do inglês <i>chemical ionization</i>)
DIF	Difenilamina
DLLME	Microextração líquido-líquido dispersiva (do inglês <i>dispersive liquid-liquid microextraction</i>)
DOT	Dosulepina
DSPE	Extração em fase sólida dispersiva (do inglês <i>dispersive solid phase extraction</i>)
ECNI	Ionização negativa com captura de elétrons (do inglês <i>electron capture negative ionization</i>)
EI	Ionização eletrônica (do inglês <i>electron ionization</i>)
eV	ElétronsVolt
FI	Ionização de campo (do inglês <i>field ionization</i>)
GAC	Química analítica verde (do inglês <i>Green Analytical Chemistry</i>)
GC	Cromatografia em fase gasosa (do inglês <i>gas chromatography</i>)
GC-FID	Cromatografia gasosa com detetor de ionização de chama (do inglês <i>Gas Chromatography with Flame Ionization Detection</i>)
GC-MS	Cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massa (do inglês <i>gas chromatography-mass spectrometry</i>)
H	Altura de pratos
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência (do inglês <i>high-performance liquid chromatography</i>)
XXIII	

IMP	Imipramina
IS	Padrão interno (do inglês <i>Internal Standard</i>)
k	Fator de retenção
K_c	Constante de equilíbrio
K_g	Kilograma
K_{O/W}	Coeficiente de partição octanol-água
K_{PDMS/W}	Coeficiente de partição entre a fase de PDMS da barra de agitação e a amostra de água
L	Comprimento da coluna
L	Litro
LC	Cromatografia Líquida (do inglês <i>liquid chromatography</i>)
LC-MS	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (do inglês <i>Liquid Chromatography-Mass Spectrometry</i>)
LC-MS/MS	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa tandem (do inglês <i>liquid chromatography-mass spectrometry</i>)
LD	Dessorção líquida (do inglês <i>liquid desorption</i>)
LLE	Extração líquido-líquido (do inglês <i>liquid-liquid extraction</i>)
LLOQ	Limite de quantificação inferior (do inglês <i>lower limit of quantification</i>)
LOD	Limite de detecção (do inglês <i>limit of detection</i>)
LOQ	Limite de quantificação (do inglês <i>limit of quantitation</i>)
LPME	Microextração de fase líquida (do inglês <i>liquid-phase microextraction</i>)
m	Massa
m	Metro
MAOIs	Inibidores da monoamina oxidase (do inglês <i>monoamine oxidase inhibitors</i>)
MeOH	Metanol
MIA	Mianserina
min	Minutos
MIR	Mirtazapina
MS	Espectrometria de massa (do inglês <i>mass spectrometry</i>)
MSA_μE	Microextração adsortiva em multi-esfera (do inglês <i>multi-spheres adsorptive microextraction</i>)
MSPE	Extração em fase sólida magnética (do inglês <i>magnetic solid phase extraction</i>)

N	Número de pratos teóricos
Pa	Pascal
PDMS	Polidimetilsiloxano
pH	Simétrico do logaritmo decimal da concentração em hidrogeniões
pKa	Simétrico do logaritmo decimal da constante de acidez
PP	Polipropileno
PS	Poliestireno
PS-DVB	Poliestireno-divinilbenzeno
PTV	Vaporizador de temperatura programada (do inglês <i>programmed-temperature vaporizing</i>)
pzc	Ponto de carga zero (do inglês, <i>point zero charge</i>)
QIT	Armadilha de iões (do inglês <i>quadrupole ion trap</i>)
QMF	Quadrupólo (do inglês <i>quadrupole mass filter</i>)
RR	Recuperação relativa
R_s	Resolução
SBSE	Extração sortiva em barra de agitação (do inglês <i>stir bar sorptive extraction</i>)
SIM	Monitorização de iões seleccionados (do inglês <i>selected ion monitoring</i>)
SPE	Extração em fase sólida (do inglês <i>solid phase extraction</i>)
SPME	Microextração em fase sólida (do inglês <i>solid-phase microextraction</i>)
TCAs	Antidepressivos tricíclicos (do inglês <i>Tricyclic antidepressants</i>)
TD	Dessorção térmica (do inglês <i>thermal desorption</i>)
TOF	Tempo de voo (do inglês <i>time-of-flight</i>)
t_R	Tempo de retenção
TRI	Trimipramina
UV	Ultravioleta
V	Volume
W	Largura da base de um pico no cromatograma
α	Fator de seletividade

1. Introdução

1.1. Depressão e antidepressivos

De acordo com a Organização Mundial de Saúde, a depressão é uma doença mental comum e uma das que provoca maior incapacidade em todo o mundo. Estima-se que 300 milhões de pessoas em todo o mundo sejam afetadas por esta doença, com maior incidência nas mulheres do que nos homens. A depressão é caracterizada por um alargado tipo de sintomas, como a tristeza, perda de interesse ou prazer, sentimentos de culpa, baixa autoestima, distúrbios no sono e no apetite, cansaço, pouca concentração, irritabilidade, dificuldade em tomar decisões, chorar sem motivo aparente, entre outras. Esta doença pode ser de longa duração ou recorrente, podendo mesmo prejudicar substancialmente a capacidade de uma pessoa não cumprir as funções no trabalho ou na escola, e ainda de conseguir lidar com o dia-a-dia. Em casos mais severos pode mesmo levar ao suicídio. A depressão pode afetar qualquer pessoa, independentemente da idade, sexo, origem étnica, religião, educação, ou estrato social. Postula-se que a depressão pode advir do desequilíbrio de neurotransmissores no cérebro, reduzindo desta forma a transmissão neuronal. As causas são diversas, nomeadamente o histórico familiar, morte de pessoas próximas, perda de trabalho, divórcio, uso de substâncias ilícitas, etc. Mas também, eventos normalmente positivos, tais como, casamento, mudança de casa, ou de trabalho podem também causar depressão, podendo ainda incluir a depressão pós-parto [1–3].

O mais recente relatório do “Programa Nacional para a Saúde Mental” (2016/17) elaborado pela Direção-Geral de Saúde, menciona que embora a esperança de vida da população esteja a aumentar, esta vive com várias incapacidades na área da saúde mental. Neste relatório é também evidente o aumento da proporção de utentes com registo de perturbações depressivas, demência e perturbações da ansiedade em Portugal continental, sendo que as perturbações depressivas passaram de 5,3 % em 2011 para 9,3 % em 2016. Quanto ao consumo de medicamentos associados à área da saúde mental, observa-se um aumento, em todos os grupos farmacológicos, entre 2012 e 2016, sendo que em 2016 foram consumidos, aproximadamente, 358 milhões de antidepressivos, enquanto em 2012 tinham apenas sido consumidos cerca de 263 milhões, registando-se assim um aumento de quase 100 milhões [4].

Os antidepressivos podem ser eficazes no tratamento de depressão moderada a severa, mas não são a primeira fase de tratamento. Esta inclui terapias, nomeadamente, cognitivo-comportamental ou psicoterapia. As duas formas de tratamento podem também ser combinadas. O tratamento depende do paciente, do tipo e da causa de depressão. Os antidepressivos permitem que pessoas com depressão consigam viver vidas praticamente normais, sem quaisquer restrições. Como cada paciente reage aos medicamentos de forma diferente, têm sido desenvolvidos muitos fármacos. Estes funcionam de diferentes formas, nomeadamente através de variadas vias bioquímicas e em diferentes áreas do cérebro. Com a evolução dos antidepressivos, têm sido feitas tentativas de classificação baseadas nas suas propriedades. Uma possibilidade é a classificação com base na sua estrutura química: monocíclicos, tricíclicos, tetracíclicos e ainda estruturas de multi-anel. Outra hipótese é a classificação com base nos mecanismos de ação farmacológicos, sendo mais elaborada e útil, uma vez que fornece informação completa sobre os fármacos em cada classe. Os antidepressivos que estão comercialmente disponíveis têm treze mecanismos diferentes, dois clássicos, exibidos pelos antidepressivos tricíclicos (TCAs, do inglês *tricyclic antidepressants*) e pelos inibidores da monoamina oxidase (MAOIs, do inglês *monoamine oxidase inhibitors*), e onze relativamente não clássicos. Os não clássicos incluem inibidores

seletivos de recaptação de serotonina, inibidores de recaptação de serotonina e noradrenalina, antagonista e inibidor da recaptação de serotonina, entre outros. Apesar do desenvolvimento de novos antidepressivos de classes não clássicas, nenhum ultrapassou os antidepressivos clássicos em termos de eficácia global em ensaios clínicos [1,3,5].

No início do século XX os tratamentos mais comuns para a depressão eram opiáceos e anfetaminas. Contudo, estes eram problemáticos por serem viciantes. Em 1951, Irving Selikoff e Edward Robitzek demonstraram que medicamentos antituberculose podiam ter uma ação antidepressiva. Foi descoberto que estes desaceleravam a quebra enzimática dos neurotransmissores dopamina, norepinefrina e serotonina, ao interferirem com a enzima monoamina oxidase, dando assim início à classe MAOIs. Contudo estes foram raramente utilizados durante 10 anos, pois causavam efeitos secundários severos, devido à sua elevada toxicidade podendo mesmo levar a grande sedação ou interações entre medicamentos. Apenas quando foi possível inibir exclusivamente o subtipo A da monoamina oxidase é que estes foram sendo mais vulgarmente utilizados. Desta forma, investigadores continuaram a trabalhar noutras categorias de antidepressivos. Os TCAs começaram a ser vastamente utilizados em 1955, com a introdução da imipramina, sendo ainda hoje largamente utilizados, apresentando modificações adicionais por forma a serem mais seguros para os pacientes [3].

1.1.1. Antidepressivos tricíclicos

O primeiro TCA a ser descoberto foi a clorpromazina, representada na Figura 1.1, sintetizada em 1950. Esta descoberta foi baseada em observações clínicas, quando se notou que um fármaco anti-histamínico possuía qualidades neurolépticas. Posteriormente, a imipramina foi desenvolvida e observou-se clinicamente que tinha propriedades antidepressivas. Os TCAs foram criados modificando um grupo de fármacos conhecidos como fenotiazinas, inicialmente utilizadas como inseticidas em 1953. As formas iniciais de TCAs tinham graves problemas de toxicidade e segurança, sendo que foram introduzidas modificações por forma a tornarem os TCAs mais seguros, como a adição de diferentes grupos estruturais, surgindo por exemplo, a amitriptilina e a desipramina [2,3].

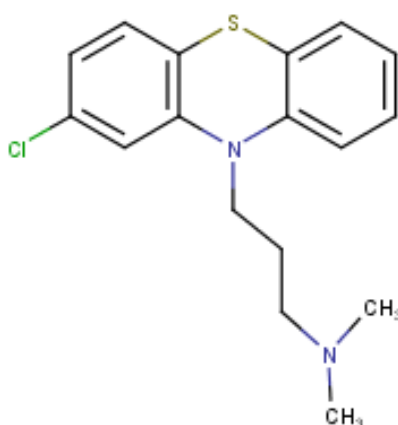


Figura 1.1 - Estrutura da clorpromazina.

O modo de ação dos TCAs consiste em bloquear a recaptação dos neurotransmissores norepinefrina e serotonina das sinapses no cérebro, tendo pouca ou nenhuma ação nas bombas de recaptação da dopamina. A inibição da recaptação da serotonina e da norepinefrina leva ao aumento do

efeito de vias inibitórias da dor, assim inibidores destes neurotransmissores são agentes moduladores de sintomas de dor [6–8].

Os TCAs possuem um núcleo iminodibenzil (tricíclico), sendo as diferenças químicas entre estes relativamente subtis. Contudo, estas pequenas diferenças resultam numa mudança significativa do perfil farmacológico, *e.g.*, a imipramina e o seu metabolito (a desipramina) diferem apenas por um grupo metilo. No entanto, a primeira é altamente anticolinérgica, e relativamente forte como inibidora da recaptação de serotonina e da norepinefrina, enquanto que a segunda é muito menos anticolinérgica e é uma inibidora da recaptação de norepinefrina muito mais potente e um pouco mais seletiva [3,5].

Os diferentes TCAs apresentam diversas indicações terapêuticas, como apresentado na Tabela 1.1 [2].

Tabela 1.1 - Indicações para o uso de diversos antidepressivos [2].

Antidepressivo	Indicações Terapêuticas
Amitriptilina	Doenças depressivas; Enurese noturna em crianças; Dor neuropática; Profilaxia da enxaqueca.
Clomipramina	Doenças depressivas; Estado obsessivo e fóbico; Cataplexia associado com narcolepsia.
Dosulepina, Lofepramina, Trimipramina	Doenças depressivas.
Doxepina	Doenças depressivas; Prurido em eczemas.
Imipramina	Doenças depressivas; Enurese noturna em crianças.
Nortriptilina	Doenças depressivas; Enurese noturna em crianças; Dor neuropática.

Nesta classe, todos os fármacos são semelhantes do ponto de vista da farmacodinâmica e farmacocinética [2]. A farmacodinâmica descreve a relação entre a concentração do fármaco e a resposta que é dada pelo organismo, enquanto a farmacocinética descreve as mudanças da concentração do fármaco em diferentes partes do corpo, estuda o percurso do mesmo após a sua administração, durante a absorção, a distribuição, o metabolismo e a excreção. Ou seja, de uma forma simplista, a farmacocinética descreve o que o corpo faz ao composto, enquanto a farmacodinâmica descreve o que o composto faz ao corpo [9,10]. Podemos concluir que a absorção, a distribuição, o metabolismo e a excreção se dará de forma semelhante em todos os TCAs estudados.

1.1.1.1. Farmacocinética dos antidepressivos em estudo

Como referido anteriormente, a farmacocinética descreve a absorção, a distribuição, o metabolismo e ainda a excreção. Estes são processos distintos, mas relacionados em diversos aspetos que ocorrem entre a administração e a eliminação do composto. Após a administração de uma dose do composto, este deverá ser absorvido através do lúmen intestinal, e não deverá ser suscetível ao metabolismo por enzimas intestinais. Depois entrará no sistema hepático, onde será enviado para o fígado para, provavelmente, sofrer o metabolismo de primeira passagem, e/ou excreção biliar antes de atingir o sistema circulatório. O metabolismo de determinado composto, nem sempre conduz à

inativação do composto, dado que este pode ser convertido em metabolitos farmacologicamente ativos, tal como no caso dos metabolitos dos TCAs [10].

A absorção de TCAs é bem-sucedida no trato gastrointestinal após a administração oral. Apesar de não ser uma causa comum na variabilidade da farmacocinética destes, sob certas condições a absorção destes compostos é influenciada por mudanças na motilidade intestinal. Por exemplo, uma dieta rica em fibras já foi associada a uma absorção reduzida e níveis menores de TCAs no plasma. O metabolismo pode ser afetado por diversos fatores, nomeadamente genéticos, idade, ou ainda fatores exteriores, como o hábito do tabaco. Por exemplo, no caso da mirtazapina mulheres e idosos têm maior concentração de plasma do que homens e jovens adultos. A absorção e a biodisponibilidade não são afetadas pela comida. Sendo compostos altamente lipofílicos, todos os TCAs mostram vasta distribuição, e ligam-se consideravelmente a proteínas plasmáticas. Na Tabela 1.2 é possível observar as principais informações sobre a farmacocinética de alguns TCAs comercialmente disponíveis em Portugal [2,11–13].

Tabela 1.2 - Informações sobre a farmacocinética para cada composto analisado.

TCAs	Farmacocinética [2,11–13]				
	Dosagem diária recomendada	Ligação a proteínas plasmáticas	Reações metabólicas principais	Outras reações metabólicas	Excreção
Amitriptilina (AMT)	50 a 150 mg Podendo ir até aos 300 mg	91 a 97%	Desmetilação (Origina nortriptilina)	Hidroxilação N-oxidação Conjugação	Principalmente excretada na urina na forma livre e como metabolitos conjugados. Até 35% de uma única dose pode ser excretada em 24 horas. A forma inalterada da droga corresponde a menos de 5% do material excretado.
Mianserina (MIA)	30 a 90 mg Podendo ir até 200 mg	≈ 90%	Metabolismo de primeira passagem (Origina N-dismetilmianserina, 8-hidroximianserina)		30 a 40% é excretada na urina em 24 horas, sendo o restante excretado ao longo de um período de vários dias, principalmente como metabolitos conjugados. Apenas 5% de uma dose é excretado de forma inalterada.
Trimipramina (TRI)	50 a 75 mg Podendo ir até 300 mg	≈ 94%	Metabolismo de primeira passagem (Origina N-mono-dismetiltripramina)		Principalmente excretada na urina como metabolitos.

Imipramina (IMP)	25 a 300 mg Podendo ir até 300 mg	85 a 95%	Metabolismo de primeira passagem principalmente por desmetilação (Origina desipramina)	Hidroxilação Conjugação	Menos de 10% é excretado na sua forma inalterada. Aproximadamente 40% de uma dose é excretado pela urina em 24 horas e o restante nas 72 horas seguintes.
Mirtazapina (MIR)	15 a 45 mg	≈ 85%	Desmetilação Oxidação	Conjugação	Na urina e no plasma são maioritariamente encontrados metabolitos conjugados 75% é eliminada na urina em apenas alguns dias.
Dosulepina (DOT)	75 a 150 mg Podendo chegar a 225 mg		Desmetilação Oxidação		50 a 60% de uma dose é excretado na urina em apenas 24 horas, principalmente na forma de metabolitos.

1.2. Monitorização de antidepressivos tricíclicos

Os fármacos antidepressivos, especialmente os clássicos, podem causar intoxicações graves se tomados em quantidades superiores às recomendadas [14]. A monitorização destes compostos é muito importante, dado que pode ajudar no controlo efetivo da farmacoterapia e da intoxicação por fármacos, na farmacologia clínica e na ciência forense. Este processo é particularmente importante para os TCAs devido à sua estreita gama terapêutica (entre os 50 e os 300 µg/L). Por outro lado, os efeitos tóxicos dos TCAs (com sintomas como alta temperatura corporal, visão enevoada, pupilas dilatadas, sono, confusão, convulsões, ritmo cardíaco rápido e paragem cardíaca) podem ser observados quando a concentração no plasma excede 500 µg/L, sendo que a morte pode ocorrer quando existam concentrações acima de 1000 µg/L [15–17].

Uma alternativa de monitorização clínica é através de imunoensaios. Contudo, o desenvolvimento dos mesmos para TCAs é muito problemático, dado que existem fármacos com estrutura semelhante à dos TCAs, o que pode interferir com a correta medição analítica. Por exemplo, este método pode resultar em falsos-positivos quando na presença de fármacos comuns como, a difenidramina, a tioridazina, a cloropromazina, a alimenazina, a carbamazepina, a ciclobenzaprina e a perfenazina. Por outro lado, os seus limites de deteção não são suficientes para muitas aplicações clínicas. Adicionalmente, os imunoensaios não permitem obter resultados fiáveis quando o paciente toma mais do que um TCA em simultâneo (bastante comum), ou em períodos de transição, devido a reatividade cruzada entre alguns TCAs. Desta forma, torna-se necessário recorrer a outros métodos analíticos que permitam alcançar limites de deteção mais baixos, e que consigam identificar diversos TCAs em simultâneo [18,19].

O plasma é o material biológico de eleição, dado que permite detetar que substâncias tóxicas possam estar presentes aquando do momento da colheita da amostra, sendo assim possível perceber

imediatamente a gravidade de uma possível intoxicação. Tem igualmente a vantagem de em casos de pacientes intoxicados, ser mais fácil a recolha, assim como a possibilidade de correlacionar entre concentração da substância detetada e condição clínica ou sintomas do indivíduo. Apesar disto, a urina também é uma matriz muito escolhida dado que é recolhida de forma não invasiva, tendo a possibilidade de recolher um volume considerável para análise. É também de notar que a urina contém altas concentrações de fármacos e metabolitos quando comparada com outras matrizes biológicas, sendo também possível obter informação sobre a cinética de eliminação das substâncias [20].

Na Tabela 1.3 é possível observar os níveis terapêuticos concretos para alguns dos antidepressivos tricíclicos vendidos em Portugal, em diversas matrizes biológicas comuns, contudo alguns valores não foram encontrados.

Tabela 1.3 - Níveis terapêuticos de concentração em urina, plasma e soro dos TCAs estudados.

TCA	Urina [11,21]		
	Níveis terapêuticos de concentração (µg/L)	Concentrações tóxicas (µg/L)	Concentrações fatais (µg/L)
AMT	35 ± 2	-	-
MIA	-	-	-
TRI	-	-	-
IMP	40 ± 4	>500	-
MIR	-	-	-
DOT	-	-	-
	Plasma [22]		
	Níveis terapêuticos de concentração (µg/L)	Concentrações tóxicas (µg/L)	Concentrações fatais (µg/L)
AMT	50-300	500-600	1500-2000
MIA	10-150	500-5000	-
TRI	10-250	500	1700-8200
IMP	50-350	500-1000	1500-2000
MIR	40-300	1000-2000	-
DOT	20-100	800	1000
	Soro [23]		
	Níveis terapêuticos de concentração (µg/L)	Concentrações tóxicas (µg/L)	Concentrações fatais (µg/L)
AMT	50-300	-	-
MIA	15-70/140	500-5000	-
TRI	10-300	500	8700
IMP	45-150	400-500	2000
MIR	20-100/300	-	-
DOT	20-150/400	800	1000/5000-19000

Para estes compostos (com a exceção da mianserina) existem relatos de mortes ocorridas devido à *overdose* acidental ou em casos de suicídio. Neste sentido, torna-se essencial desenvolver métodos analíticos para a determinação de TCAs em amostras biológicas que sejam sensíveis, simples, precisos

e fáceis de aplicar. A determinação dos níveis de TCAs é necessária para triagens toxicológicas de emergência, testes de abuso de drogas e exames médicos forenses para fatalidades com probabilidade de terem sido causadas por *overdoses* de TCA. A concentração destas drogas em fluidos biológicos humanos (como por exemplo, plasma, soro ou urina) é determinada principalmente por métodos cromatográficos ou eletroforéticos, *e.g.*, cromatografia em fase gasosa (GC, do inglês *gas chromatography*), ou cromatografia líquida (LC, do inglês *liquid chromatography*), ou ainda eletroforese capilar (CE, do inglês *capillary electrophoresis*). A análise direta das amostras é sempre a ideal, embora não seja possível no caso de fluidos biológicos devido à complexidade destas matrizes, o que limita a seletividade e sensibilidade analítica. Então para análises farmacêuticas é sempre necessário um passo prévio de preparação de amostras [11,16,17,19,24].

1.3. Metodologias analíticas para a análise de TCAs

De acordo com a literatura podemos concluir que diferentes estudos analisam os antidepressivos tricíclicos de forma distinta, variando tanto o processo de preparação de amostras como a técnica de análise, assim como o tipo de matrizes. Como técnicas de extração é possível encontrar estudos recorrendo a, microextração líquido-líquido dispersiva (DLLME, do inglês *dispersive liquid-liquid microextraction*) [19,25,26], extração em fase sólida magnética (MSPE, do inglês *magnetic solid phase extraction*) [17], microextração de fase líquida suportada por fibra oca (HF-LPME, do inglês *hollow-fiber liquid-phase*) [27,28], extração em fase sólida (SPE, do inglês *solid-phase extraction*) [19,23], extração líquido-líquido (LLE, do inglês *liquid-liquid extraction*) [14,29], microextração em fase sólida (SPME, do inglês *solid-phase microextraction*) [30,31], extração sortiva em barra de agitação (SBSE, do inglês *stir bar sorptive extraction*) [32] entre outras. Por forma a analisar as amostras é possível encontrar estudos com recurso a cromatografia em fase gasosa acoplada à espetrometria de massa (GC-MS, do inglês *Gas Chromatography-Mass Spectrometry*) [16,20,24,27,28], cromatografia gasosa com detetor de ionização de chama (GC-FID, do inglês *Gas Chromatography with Flame Ionization Detection*) [24,33,34], cromatografia líquida de alta eficiência com detetor de ultravioleta (HPLC-UV, do inglês *High-Performance Liquid Chromatography-Ultraviolet*) [19,21,26,28], cromatografia líquida acoplada à espetrometria de massa tandem (LC-MS/MS, do inglês *liquid chromatography-mass spectrometry*) [14,18,29], entre outros. Apesar de existirem diversas metodologias de análise de TCAs em matrizes biológicas decidiu-se desenvolver um novo método que pudesse ser mais bem-sucedido, com melhores recuperações e gama linear mais abrangente.

1.4. Técnicas de preparação de amostras

A preparação de amostras é necessária em diversos métodos cromatográficos, espectroscópicos e eletroforéticos, principalmente se as amostras forem complexas, como são o caso das matrizes ambientais, alimentares ou biomédicas. Em muitos esquemas analíticos a preparação das amostras pode ser superior a 60 % do tempo despendido e origina erros em mais de 30 % dos casos, especialmente se as metodologias forem desenvolvidas para análise vestigial. Em geral, os passos de preparação de amostra incluem extração, com o objetivo de transformar a amostra numa solução apropriada para a

análise instrumental que seja, compatível com a instrumentação analítica; concentração dos solutos se estes tiverem presentes na matriz original a níveis vestigiais; eliminação de interferências indesejáveis. Os últimos anos foram marcados pelas novas abordagens de preparação de amostras por forma a simplificar, miniaturizar, aumentar a seletividade e a sensibilidade, em particular, em análises vestigiais, utilizando dispositivos analíticos de fácil manipulação, reduzindo ou excluindo solventes orgânicos tóxicos, utilizando um baixo volume de amostra, em concordância com os princípios da Química Analítica Verde (GAC, do inglês *Green Analytical Chemistry*). Estes últimos avanços deram-se por se considerar que o passo de preparação das amostras é o mais poluidor de todo o processo analítico [35–38].

Desta forma, foram surgindo técnicas de preparação de amostras que minimizam o consumo de solvente, nomeadamente a SPME, SBSE, microextração de gota-única (SDME, do inglês *single-drop microextraction*), e microextração de fase líquida (LPME, do inglês *liquid-phase microextraction*), entre outras. Estas reduzem o consumo de solvente ao se miniaturizar o processo, enquanto levam também a uma maior sensibilidade, a um potencial reduzido de perda de analito e à redução de amostra necessária para análise [36].

A SPME e a SBSE reproduzidas na Figura 1.2, são os métodos baseados em microextração sortiva mais utilizados, sendo também utilizados na análise de TCAs [30–32]. Entre outras vantagens, a SBSE é *solventless* e a SPME é *solventfree*, são técnicas que combinam simultaneamente, num único passo, a extração e concentração dos analitos. Apresentam manipulação fácil e rápida, requerem pouco volume de amostra, são pouco dispendiosas, podem ser facilmente combinadas com instrumentação analítica moderna, têm vindo a demonstrar aplicações nas mais diversas áreas e sua reutilização pode ser considerada. A fase de extração sortiva mais utilizada é o polidimetilsiloxano (PDMS), dado que sorventes inorgânicos interagem fortemente com os compostos adsorvidos. São necessárias altas temperaturas para a desadsorção, que levam à degradação do PDMS. Por outro lado, os sorventes orgânicos sofrem decomposição térmica e têm atividade catalítica significativa [35,36,39,40].

Apesar das duas serem baseadas nos mesmos princípios, a SBSE exhibe maior sensibilidade, ao possuir uma quantidade maior de fase sorvente. É também mais robusta, e tem sido bem-sucedida quando aplicada à monitorização de compostos orgânicos vestigiais em matrizes reais. Por outro lado, a SPME tem menor capacidade, devido à quantidade limitada de fase sorvente. Para além disso, as fibras são mais dispendiosas e frágeis, particularmente se estiverem envolvidas amostras sujas e complexas, dado que promovem a rápida degradação através do modo de imersão, assim é essencial experiência prática [35].

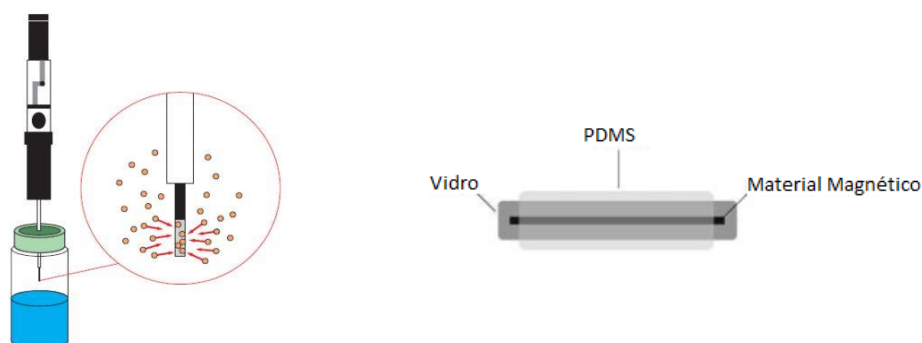


Figura 1.2 – a: Esquema representativo da técnica SPME em modo headspace [40]; b: Esquema representativo do dispositivo utilizado em SBSE. Adaptado de [38].

1.5. Extração sortiva em barra de agitação (SBSE)

A técnica SBSE foi introduzida em 1999 por Baltussen *et al.* Os dispositivos analíticos de SBSE são constituídos por barras de agitação magnéticas incorporadas dentro de tubos de vidro selados e revestidos exteriormente por PDMS (Figura 1.2). Esta é uma fase polimérica apolar que promove interações hidrofóbicas com as moléculas alvo, onde o mecanismo de retenção ocorre principalmente através de forças de “Van-der-Waals”, embora ligações de hidrogénio também possam acontecer com os átomos de oxigénio do PDMS dependendo da estrutura molecular dos analitos. O processo de extração é baseado no equilíbrio PDMS-água [35,36,38,41,42].

Em qualquer esquema analítico que envolva SBSE, o princípio da operação consiste em dois passos fundamentais, estes são: (1) extração ou enriquecimento de analitos do seio da amostra para o PDMS, através de um processo de absorção, utilizando os modos de amostragem por imersão ou espaço cabeça (2) seguido por retroextração ou dessorção dos mesmos da fase polimérica para o sistema cromatográfico, utilizando os modos de dessorção térmica (TD, do inglês *thermal desorption*) ou dessorção líquida (LD, do inglês *liquid desorption*). De forma a obter máxima eficiência a extração deve ser efetuada sob condições de estado estacionário, onde o controlo de diversos parâmetros experimentais é sempre obrigatório. Ensaio sistemáticos devem ser efetuados frequentemente, para otimizar as variáveis mais importantes que influenciam o processo de extração. Estas variáveis são, o tempo de equilíbrio, a velocidade de agitação, o ajustamento do pH, a polaridade e força iónica da matriz, etc. Algumas destas variáveis afetam a cinética da extração (ou seja, o tempo de equilíbrio e a velocidade de agitação), bem como, a interação entre os analitos e a fase PDMS (ou seja, pH, polaridade e força iónica da amostra). Na retroextração o modo TD está limitado para solutos termicamente estáveis, voláteis a semi-voláteis, enquanto LD é normalmente indicado para compostos termolábeis, semi-voláteis a não voláteis. O modo TD é apenas compatível com análise por GC, enquanto que o modo LD é compatível tanto com análise por GC como por HPLC ou mesmo por CE [35,38,41].

A SBSE é uma técnica de equilíbrio. Para amostras de água, a extração de compostos da fase aquosa para a fase extrativa é controlada pelo coeficiente de partição dos compostos entre estas duas fases ($K_{PDMS/W}$). Estudos mencionam que existe uma correlação entre este coeficiente de partição e o coeficiente de distribuição octanol-água ($K_{O/W}$). Assim, o coeficiente de distribuição entre o PDMS e a água ($K_{PDMS/W}$) é definido pela razão entre a concentração do analito na fase de PDMS (C_{PDMS}) e na fase aquosa (C_W), depois de atingido o equilíbrio da extração, tal como é descrito pela equação 1.1, onde m_{PDMS} é a massa do analito na fase de PDMS, m_W a massa do analito na fase aquosa, V_W o volume de amostra na fase aquosa e V_{PDMS} o volume em PDMS [42–44].

$$K_{O/W} \approx K_{PDMS/W} = \frac{C_{PDMS}}{C_W} = \frac{m_{PDMS}}{m_W} \times \frac{V_W}{V_{PDMS}} \quad 1.1$$

Esta técnica apresenta diversas vantagens. As barras de agitação podem ser utilizadas centenas de vezes sem mostrar degradação física do revestimento em PDMS, dependendo da amostra, apenas limpando com solventes adequados (como por exemplo, acetonitrilo) ou com recurso a tratamento TD. Comercialmente estão, atualmente, apenas disponíveis dispositivos de SBSE da marca Twister® revestidos com PDMS ou poli(etileno glicol) em PDMS. O PDMS tem propriedades de difusão e termoestabilidade muito interessantes, o que permite trabalhar com vastas gamas de temperaturas. Contudo esta é uma limitação da SBSE, dado que devido à apolaridade do polímero PDMS, os

compostos polares (ou seja, $\log K_{O/W} < 3$) não são bem extraídos. A alta viscosidade destas fases diminui a velocidade da difusão dos analitos durante a extração, resultando num tempo de equilíbrio mais longo [36,38,39,41].

Para ultrapassar esta limitação foram desenvolvidas estratégias e conceitos analíticos inovadores ou novas abordagens baseadas em sorção alternativas, incluindo ensaios de multi-modo, procedimentos de derivatização, novas fases poliméricas ou abordagens baseadas em sorção, como técnicas de microextração adsortiva (A μ E, do inglês *adsorptive micro-extraction*). Esta última técnica surge por forma a conseguir extrair com sucesso analitos polares, ao contrário da SBSE [38,41].

1.6. Técnicas de microextração adsortiva

Recentemente tem sido dada muita atenção à procura da simplificação, miniaturização, automatização e ao uso de técnicas sem solventes, bem como a outros procedimentos amigos do ambiente. Assim o desenvolvimento e melhoramento de técnicas de extração miniaturizadas tem ganho muita importância. Assim surgem novos métodos de microextração, como a A μ E, com a especial vantagem em relação a outras técnicas de sorção, de possibilitar a escolha de qual o material mais apropriado para extrair determinado analito ou grupo de compostos. Este tipo de técnicas de preparação de amostras têm vindo a receber muita atenção por obedecerem aos princípios da GAC, pelos motivos acima referidos e ainda por combinar a amostragem, isolamento e enriquecimento num único passo [38,45,46].

Atualmente existem duas configurações geométricas já projetadas para A μ E utilizando substratos com forma de barra e esfera, fundamentais para o desempenho da tecnologia de amostragem flutuante. De acordo com as configurações geométricas dos dispositivos, estão disponíveis duas técnicas, microextração em barra adsortiva (BA μ E do inglês, *bar adsorptive microextraction*) e microextração multi-esfera adsortiva (MSA μ E, do inglês *multi-spheres adsorptive microextraction*), é possível observar a geometria com mais atenção na Figura 1.3. Na configuração multi-esferas, o dispositivo cobre inicialmente os substratos esféricos de poliestireno (PS), seguido por fixação através

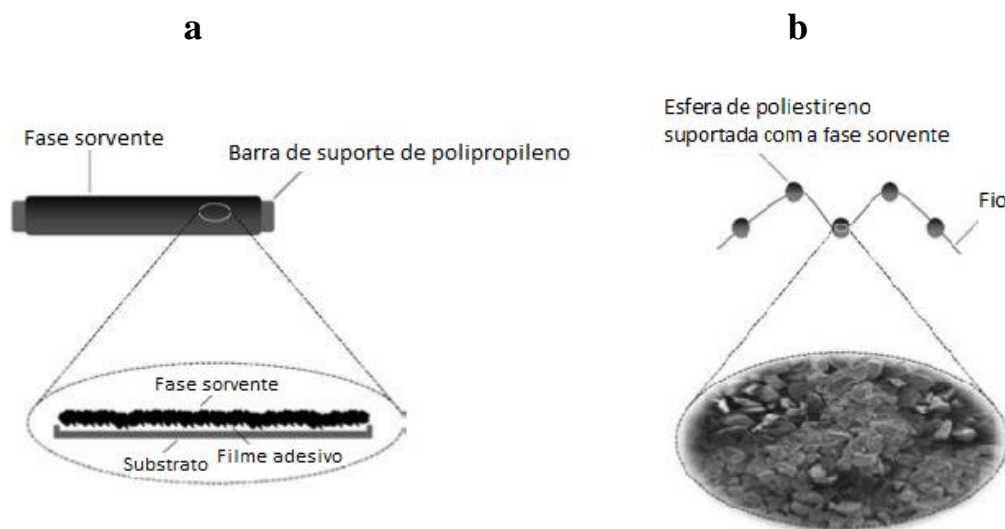


Figura 1.3 - Representação esquemática e imagem dos dispositivos utilizados em técnicas de microextração adsortiva, para BA μ E (a), e MSA μ E (b). Adaptado de [38].

de tratamento térmico (suporte térmico), enquanto na configuração em barra, o revestimento sorvente é fixado com filmes adesivos convenientes em substratos de polipropileno (PP) cilíndricos [38].

1.6.1. Princípios e vantagens

Normalmente os materiais sólidos adsorvem facilmente moléculas polares, uma vez que apresentam vastas áreas específicas e estruturas porosas com nano textura com locais de ativação adequados, onde as interações eletrostáticas e/ou dispersivas (propriedades “adsorção-desadsorção”) ocorrem. Contudo, sorventes em pó podem ser difíceis de manipular do ponto de vista prático, dado que são constituídos por materiais bastante divididos compostos por milhares de partículas microscópicas (tamanho da partícula inferior a 30 μm). Ainda assim, se estes materiais em pó poderem ser fixados ou suportados por substratos adequados através de tecnologias baseadas em fixação, os novos dispositivos podem representar uma alternativa credível para analisar compostos polares [38].

A grande vantagem desta nova técnica, é que os dispositivos de microextração podem ser preparados em laboratório, utilizando o sorvente mais conveniente para cada tipo de aplicação, a um custo baixo e num curto intervalo de tempo. Os dispositivos podem ser preparados utilizando materiais de revestimento sorvente fixados a substratos convenientes. A preparação destes dispositivos deve iniciar-se pela escolha da fase sorvente mais seletiva de forma a reter os analitos alvo. Materiais como carvões ativados (ACs, do inglês *Activated Carbons*), alumina, sílica, cortiça, bem como, poliestireno-divinilbenzeno (PS-DVB), pirrolidina modificada, ou polímeros baseados em sílica, entre outros, estão disponíveis comercialmente, são normalmente utilizados em SPE, e conhecidos pelas fortes propriedades sortivas, ou ainda novos nanomateriais, como nanotubos de carbono, e nanotubos de carbono de paredes múltiplas [38,45,47].

Dependendo do tipo de fases envolvidas, os ACs, apresentam principalmente mecanismos eletrostáticos e/ou dispersivos, enquanto que materiais baseados em polímeros são quase todos do tipo fase-reversa, ao reter analitos de acordo com ligações π - π , dipolo-dipolo, e de pontes de hidrogénio e interações iónicas. Nos polímeros, geralmente, o tamanho da partícula, a área específica, a microporosidade e o pH são propriedades importantes, que se sabe terem grande influência nos mecanismos de interação envolvidos entre as moléculas alvo e a rede de sorventes. É importante realçar que alguns sorventes apresentam uma eficiência muito maior quando oferecem múltiplos mecanismos de retenção, quando comparando com outros materiais, o que na maioria das vezes é recomendado, aumentando a seletividade e capacidade global [38].

Outra vantagem da utilização da BA μ E, é a diminuição do volume de solvente necessário para a desadsorção, quando comparando com SPE. Também comparando com SPE não é necessário secar o volume final do solvente sob fluxo de nitrogénio. O volume de amostra utilizado é muito menor. Tal como referido anteriormente combina a amostragem, isolamento e enriquecimento num único passo. Os dispositivos são baratos e fáceis de preparar e de manipular. Demonstra excelente desempenho, duplica o fator de enriquecimento e reduz os limites analíticos [46–48].

Recentemente foram desenvolvidos novos dispositivos, ao diminuir o comprimento original dos dispositivos de 15 mm para 7,5 mm, mantendo o diâmetro, o que possibilitou a diminuição do volume de solvente necessário de 200 μL para 100 μL , assim como a redução da manipulação experimental durante a fase de retroextração, tornando assim a técnica mais simples e mais amigável ao ambiente [49,50].

1.6.2. Desenvolvimento do método com A μ E

Tanto dispositivos de BA μ E como dispositivos de MSA μ E, revestidos com materiais sorventes convenientes, são introduzidos em frascos de amostragem, para funcionar no modo de tecnologia por flutuação. Isto funciona devido à baixa densidade que apresentam. Adiciona-se também uma barra de agitação magnética convencional, para promover o movimento rotacional estável da matriz líquida, e simultaneamente, a difusão dos solutos em direção à fase sorvente, com alta estabilidade e reprodutibilidade. A maior vantagem desta técnica é não existir contacto entre o dispositivo e as paredes ou o fundo do frasco, o que minimiza a desagregação dos sorventes, aumentando o tempo de vida do mesmo. A Figura 1.4 é uma representação esquemática do processo de extração através da agitação [38,45].

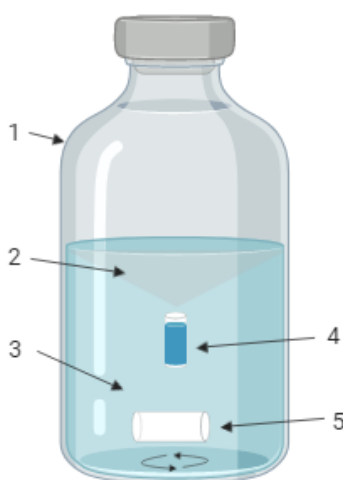


Figura 1.4 - Representação esquemática do processo de extração para os dispositivos BA μ E
(1 – Frasco de Amostragem; 2 – Vórtice; 3 – Amostra; 4 – μ -dispositivo em barra; 5 – Barra de agitação de Teflon).

O procedimento experimental desta técnica consiste em duas fases principais: (1) a extração e a pré-concentração dos analitos na fase sorvente, e (2) a desadsorção para um líquido que será posteriormente injetado num sistema analítico. Ambos os passos requerem um processo de otimização. O processo de otimização das condições experimentais é semelhante, por exemplo, ao da técnica SBSE, e é sempre essencial para cada tipo de aplicação. Para maximizar a eficiência das técnicas A μ E, para além do tipo de material sorvente e da quantidade envolvida, devem ser realizados ensaios sistemáticos em parâmetros nomeadamente, tempo de equilíbrio, velocidade de agitação e características da matriz, isto é, pH, polaridade e força iónica. Normalmente para obter condições tão estáveis como em SBSE, é necessário menos horas de equilíbrio e uma velocidade de agitação mais baixa, facilitando o processo [38,45].

Outro benefício do método é a facilidade de preparação de dispositivos para as técnicas A μ E, independentemente do revestimento sorvente envolvido, e ainda mais importante é a possibilidade de escolha da fase mais específica e conveniente para cada soluto ou classe de compostos em particular [38].

A otimização dos parâmetros da retroextração é muito importante. Parâmetros como, o tipo de solvente e o tempo de dessorção, bem como o número de passos de dessorção. Normalmente a retroextração é processada sob tratamento de ultrassons, processo onde o pH tem um papel muito importante [38].

A otimização global deve ser sempre efetuada para garantir as condições de validação mais convenientes para qualquer aplicação específica, onde a reprodutibilidade deve atingir os requisitos necessários [38].

1.7. Cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massa

A técnica analítica GC-MS é uma das mais utilizadas para a identificação e quantificação de substâncias orgânicas em matrizes complexas. Daí ser indispensável em variados campos como, entre outros, ciências ambientais, ciências forenses, cuidado médico, investigação médica e biológica, segurança e saúde, indústria das fragâncias e dos sabores, segurança alimentar [51].

Em toxicologia clínica é usual trabalhar-se com sistemas GC-MS devido à elevada sensibilidade e seletividade. Esta técnica é igualmente robusta e encontra-se disponível com custos aceitáveis (sendo mais comum a sua existência em numerosos laboratórios) [20].

Tal como o nome indica, GC-MS consiste em duas técnicas analíticas poderosas combinadas. Enquanto a cromatografia gasosa (GC, do inglês *Gas Chromatography*) separa no tempo os componentes de uma mistura, a espectrometria de massa (MS, do inglês *Mass Spectrometry*) fornece informação que ajuda na identificação estrutural de cada componente. É possível observar a representação de um aparelho GC-MS na Figura 1.5 [51].

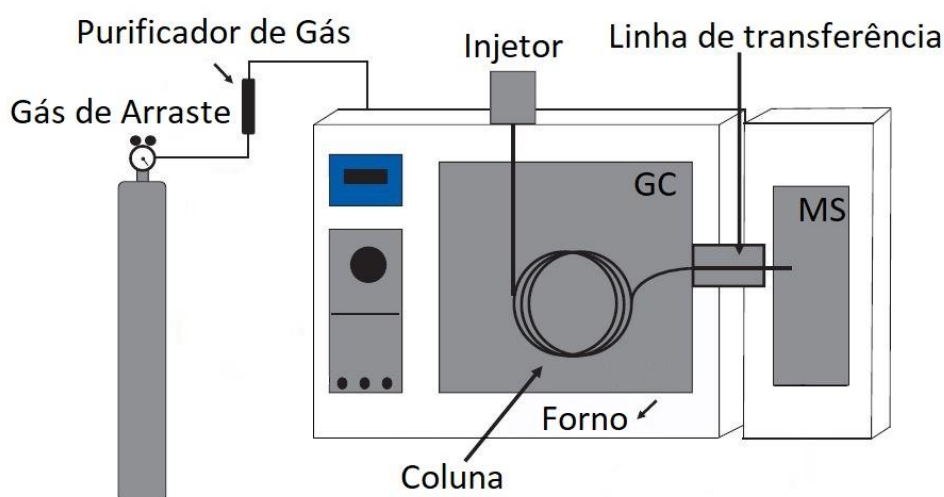


Figura 1.5 - Representação Esquemática de um GC-MS simples. Adaptado de [51].

Esta técnica permite obter um espectro de massa completo com apenas femtomoles ($\text{moles} \times 10^{-15}$) de um analito. Este espectro, irá idealmente, fornecer informação da massa nominal e o padrão de

fragmentação característico, ou “impressão digital química”, que pode depois ser utilizada como base para a identificação do componente, em conjunto com o tempo de retenção do cromatograma [51].

Pouco depois do desenvolvimento do GC, surgiram rapidamente tentativas de acoplar o cromatógrafo gasoso com o espectrômetro de massa. O GC-MS está limitado a analitos voláteis e termolábeis. Mesmo com esta limitação existem muitos analitos que podem apenas ser separados de misturas complexas e identificados utilizando GC-MS [51].

A técnica de ionização mais utilizada em GC-MS é a ionização eletrônica (EI, do inglês *Electron Ionization*), devido à extensa fragmentação que esta causa. É possível a identificação inequívoca de muitos compostos dado que estes produzem padrões únicos de fragmentação que podem ser utilizados com o tempo de retenção do cromatógrafo. Os limites de detecção podem ser diminuídos utilizando técnicas de aquisição de dados especiais, tais como, a monitorização de iões selecionados (SIM, do inglês *Selected Ion Monitoring*). Na maioria dos casos, a informação dada pelo GC-MS envolve uma gama contínua de valores m/z , registando quaisquer abundâncias de iões a quaisquer valores de m/z dentro da gama selecionada. No modo SIM cada ciclo de aquisição do instrumento mede a corrente iónica para alguns valores de m/z , saltando de valor em valor e tendo um tempo de permanência em cada ião de forma a medir a sua corrente iónica (abundância). Esta técnica pode ser empregue em instrumentos, tais como, o espectrômetro de massa de transmissão quádrupla. Quando o modo SIM é aplicado podem ser utilizados razões de três iões para a identificação inequívoca devido à extensa fragmentação [51].

A configuração de cromatógrafo gasoso pode variar, por exemplo, pode ter dois ou mais injetores. O sistema GC-MS é controlado por um computador que controla os parâmetros físicos do sistema, tais como, zonas de temperatura e fluxo de gás. Para além disso o computador também controla os dados gerados durante uma corrida [51].

No Anexo 1 apresentam-se mais informações sobre esta técnica, especialmente, sobre os diferentes componentes do mesmo.

1.7.1. Métodos de quantificação

Após os procedimentos de cromatografia e espectrometria de massa estarem estabelecidos, deve ser decidido um método de quantificação, e padrões analíticos devem ser preparados. Um branco deve ser preparado e processado da mesma maneira que as amostras e os padrões, este deve ser analisado no início de cada série de análises e após o mais concentrado para verificar que o sistema está livre de contaminações e que não há transferência de analito [51].

Em GC a concentração dos compostos eluídos é proporcional à área do pico correspondente. A integração de cada pico permite obter a área do mesmo. O método de adição padrão é uma técnica prática para a calibração. Partes da amostra são fortificadas com uma concentração conhecida de padrão, e o aumento da área dos picos é proporcional ao padrão adicionado [52].

Para quantificações precisas em GC-MS utiliza-se o método do padrão interno (IS, do inglês *Internal Standard*). Este método requer a fortificação da amostra com uma quantidade conhecida do composto a ser utilizado como padrão interno. O IS é adicionado a todas as amostras, brancos e padrões. O melhor IS é um composto que seja quimicamente similar aos compostos a serem analisados, mas que elua num espaço vazio do cromatograma. O IS deverá ser um composto que será impossível encontrar na matriz da amostra, para que a única fonte de IS seja a quantidade adicionada. Se o IS for bem

escolhido e utilizado poderá compensar variados tipos de erros, tanto sistemáticos como aleatórios. Este método compensa variações em parâmetros físicos, como imprecisões a pipetar e a injetar volumes de amostra na ordem dos microlitros. A razão entre a área do analito e a área do IS é medida e permanecerá igual com pequenas variações do volume injetado e das condições cromatográficas [51–53].

2. Objetivos

A presente dissertação tem como principal objetivo o desenvolvimento de um método analítico capaz de determinar quantidades de seis TCAs (amitriptilina, mianserina, trimipramina, imipramina, mirtazapina e dosulepina) em amostras reais, nomeadamente, urina. Tendo por base a técnica de microextração adsorptiva em barra seguida de dessorção líquida e análise por GC com injeção de grandes volumes acoplada à espectrometria de massa operando no modo de monitorização de iões selecionados (BA μ E-LD/LVI-GC-MS(SIM)).

As questões que se propõe responder são:

- Qual será um sistema analítico adequado para a análise de TCAs?
- Quais as condições ideais para a extração de TCAs?
- Será possível a utilização do método desenvolvido em contexto clínico forense e de controlo *antidoping*?
- Será o mais recente ciclo analítico envolvendo BA μ E bem-sucedido quando utilizado em conjunto com GC-MS?

Assim foram traçados os seguintes objetivos:

- Seleção do material sorvente (ACs ou polímeros) adequados para a microextração seletiva dos analitos de interesse;
- Otimização da metodologia segundo vários parâmetros que pode afetar a eficiência na recuperação dos analitos (como por exemplo, velocidade de agitação, tempo de equilíbrio, pH, modificador orgânico, força iónica, tipo de solvente, tempo de dessorção);
- Validação da metodologia desenvolvida em urina;
- Aplicação do método analítico a matrizes reais, como a urina.

3. Parte experimental

3.1. Reagentes químicos, materiais sorventes e amostras

O metanol (MeOH, 99,9%) e o acetonitrilo (ACN, 99,9%) de qualidade para HPLC e, o ácido fórmico (CH₂O₂, 99%), o ácido acético (CH₃COOH, 99,5 %), o diclorometano (CH₂Cl₂, 99,9%) foram obtidos da Carlo Erba (Espanha). A trietilamina (C₆H₁₅N, 99%) foi obtida da Merck (Alemanha). O hidróxido de sódio (NaOH, 98%) foi obtido da BDH Chemicals (Inglaterra). O ácido fosfórico (H₃PO₄, 85%) e o hidrogenofosfato dissódico (Na₂HPO₄, 99%) foram obtidos da Panreac (Espanha). A *n*-etilbutilamina (C₆H₁₅N, 99%) foi obtida da Aldrich (Estados Unidos da América). O carbonato de potássio (K₂CO₃, 99%) e o borohidreto de sódio (NaBH₄) foi obtido da Riedel-de Haën (Alemanha). O ácido clorídrico (HCl, 37%) foi obtido da Sigma-Aldrich (Austria). A água ultra-pura foi obtida pelo sistema de purificação de água Milli-Q (Milipore, Estados Unidos da América).

Os antidepressivos em forma de comprimido foram utilizados para produzir os padrões analíticos de acordo com trabalhos anteriores [54,55]. O cloridrato de amitriptilina (AMT), nome comercial ADT (10 mg), foi obtido da Generis (Portugal). O cloridrato de mianserina (MIA), nome comercial Tolvon (30 mg), foi obtido da Merck Sharp & Dohme (Portugal). A trimipramina (TRI), nome comercial Surmontil (35 mg), foi obtido dos Laboratórios Vitória (Portugal). O cloridrato de imipramina (IMP), nome comercial Tofranil (10 mg), foi obtido da Amdipharm (Irlanda). A Mirtazapina (MIR), nome comercial Mirtazapina Alter (15 mg), foi obtida da Alter (Portugal). O cloridrato de dosulepina (DOT), nome comercial Protiadene (75 mg), foi obtido da Teofarma (Itália). A difenilamina ((C₆H₅)₂NH, 98%) (DIF), foi obtida da Sigma-Aldrich (Estados Unidos da América).

Os carvões ativados foram sintetizados, caracterizados e gentilmente cedidos pela Professora Doutora Elina B. Caramão (Universidade de Tiradentes, Laboratório de Biotecnologia Industrial, Aracaju – Sergipe, Brasil). Obtidos a partir de fibra de coco (AC1 pH_{PZC} 6,3 área superficial (BET) 1130 m²/g tamanho da maioria dos poros <20 Å), resíduo de café (AC2 pH_{PZC} 7,3 área superficial (BET) 1308 m²/g tamanho da maioria dos poros <20 Å), palha de cana (AC3 pH_{PZC} 5,9 área superficial (BET) 1185 m²/g tamanho da maioria dos poros <20 Å), e bagaço de cana (AC4 pH_{PZC} 6,9 área superficial (BET) 791 m²/g tamanho da maioria dos poros <20 Å) [56].

As informações sobre os polímeros utilizados foram disponibilizadas pelos fornecedores. O polímero que contém *N*-vinilpirrolidona de fase reversa Strata™-X (SX tamanho das partículas: 33 µm tamanho dos poros: 85 Å área superficial: 800 m²/g), o polímero de estireno-divinilbenzeno de fase reversa Strata® SDBL (Strata DVB tamanho das partículas: 100 µm tamanho dos poros: 260 Å área superficial: 500 m²/g) e o polímero com ciano de fase reversa Strata® CN (tamanho das partículas: 55 µm tamanho dos poros: 70 Å área superficial: 500 m²/g) foram fornecidos pela Phenomenex (Estados Unidos da América). O co-polímero de *N*-vinilpirrolidona-divinilbenzeno de fase reversa, Oasis® HLB (HLB tamanho das partículas: 30 µm tamanho dos poros: 80 Å área superficial: 830 m²/g), foi adquirido da Waters (Estados Unidos da América). O polímero octadecil de fase reversa Supelclean ENVI-18 (C18 tamanho das partículas: 45 µm tamanho dos poros: 60 Å área superficial: 475 m²/g) foi fornecido pela Supelco (Alemanha). O co-polímero etilvinilbenzeno-divenilbenzeno de fase reversa (DVB Merck tamanho das partículas: 40-120 µm tamanho dos poros: 60 Å área superficial: 1200 m²/g) foram adquiridos da Merck (Alemanha).

Os fluidos biológicos (urina) foram gentilmente cedidos pela Clínica Joaquim Chaves Saúde (Lisboa). As amostras de urina para o estudo da validação foram obtidas de uma voluntária do sexo feminino (23 anos) que garantiu não ter consumido quais um dos TCAs em estudo. Todas as amostras foram armazenadas no congelador (-20 °C) até serem analisadas.

3.2. Material e equipamento

Para além do material corrente de laboratório foram utilizadas microseringas de alta precisão com êmbolo flexível de 10, 50 e 500 µL (Hamilton, Estados Unidos) uma micro-pipeta de 5 mL (VWR International, Estados Unidos da América) uma micropipeta de 200-2000 µL (Labbox, Espanha) uma micropipeta de 100-5000 µL (Labbox, Espanha) frascos de vidro de 5 mL, 25 mL e 50 mL (VWR International, Estados Unidos da América) e as respetivas tampas de plástico (diâmetro = 18 mm / diâmetro = 22mm) barras de agitação de *teflon* 22 × 5 mm, 40 × 8 mm, 12 × 3 mm (VWR Internacional, Estados Unidos da América) *vials* transparentes de 1,5 mL (VWR Internacional, Estados Unidos da América) e respetivas tampas (diâmetro = 11 mm) *inserts* (200 µL, 31 × 6 mm VWR Internacional, Estados Unidos da América) e um encapsulador manual (Agilent Technologies, Estados Unidos da América) filtros de seringa *nylon* 25 mm-0,45 µm (Labor Spirit, Portugal) seringas de uso único Inkjet 2mL e 20 mL (Braun, Alemanha) tubos de centrifuga graduados com tampa de rosca, 50 mL, PP (Labbox, Espanha) tubos de *falcon* para transporte de amostras 10 e 50 mL (Labbox, Espanha).

As pesagens foram efetuadas em balança analítica (Mettler Toledo AG135, Suíça). Utilizou-se ainda um banho de ultrassons equipado com termóstato modelo 3510 E-DTH (Branson, EUA), um vortex (Velp, Itália) e placas de agitação múltipla com quinze posições para amostras (Variomag, Alemanha). O pH das amostras foi controlado com recurso a um medidor de pH modelo 744 pH Meter contendo um eletrodo combinado de vidro (Metrohm, Suíça). Uma estufa modelo ED 115/E2 (Binder, Alemanha). O rotavapor utilizado na preparação das amostras foi o Laborota 4000 Efficient (Heidolph, Alemanha). Utilizou-se também um congelador vertical Jocel JCV-220L (Jocel, Portugal).

As análises por GC-MS foram efetuadas no sistema Agilent Technologies (Alemanha), constituído por um cromatógrafo gasoso (Agilent 6890 Series) equipado com amostrador automático (Agilent 7683) e injetor de vaporização com temperatura programada (PTV), acoplado ao detetor seletivo de massa (Agilent 5973N). Todos os dados registados e o controlo instrumental foram efetuados a partir do software MS ChemStation (G1701 versão E.02.02.1431 Agilent Technologies). A coluna capilar utilizada foi a Zebron ZB-5 30,0 m × 0,25 mm × 0,25 µm 5% Fenil, 95% Polidimetilsiloxano (Phenomenex, Estados Unidos da América).

3.3. Método experimental

3.3.1. Preparação das soluções padrão

As soluções padrões foram preparadas em MeOH, guardadas a -20 °C durante a duração do trabalho, e renovadas quando necessário.

Devido à dificuldade em obter padrões analíticos para os compostos em estudo foi necessário proceder à preparação de soluções padrão para cada TCA a partir dos respectivos comprimidos. A solução *stock* de cada TCA foi preparada individualmente, com as concentrações descritas na Tabela 3.1. Estas foram preparadas esmagando o comprimido num frasco de vidro, onde se colocou 10 mL de MeOH, posteriormente utilizou-se o vórtex, durante aproximadamente 10 s, colocou-se sob tratamento ultrassónico durante 15 min, colocou-se no vórtex novamente, e por fim utilizou-se a centrífugadora durante 10 min, a 3000 rpm, este procedimento foi baseado em artigos anteriores [54,55].

Tabela 3.1 - Dosagem de cada comprimido e respetiva concentração da solução padrão mãe.

TCA	Dosagem do comprimido (mg)	Concentração da solução mãe (mg/L)
AMT	10	1000
MIA	30	3000
TRI	25	2500
IMP	10	1000
MIR	15	1500
DOT	75	7500

A partir das soluções iniciais foi preparada uma solução mistura com concentração de 100,0 mg/L de cada TCA, esta foi preparada semanalmente. As soluções de trabalho e de calibração foram preparadas a partir da diluição adequada da solução mistura de 100,0 mg/L. A solução *stock* de DIF (escolhido como IS) foi preparada através da dissolução em 1 mL de MeOH de 1 mg de DIF, tendo a concentração final de 1000,0 mg/L, as soluções necessárias foram preparadas através da diluição adequada da solução anterior. As soluções de trabalho foram preparadas diariamente.

3.3.2. Condições instrumentais

Por forma a ser possível alcançar as melhores condições instrumentais, injetou-se uma solução mistura dos TCAs no GC-MS em modo *full scan*. A partir dos dados obtidos, analisou-se cada composto individualmente para adquirir os parâmetros de retenção e os espetros de massa correspondentes. De seguida, o íão alvo (pico base) e os dois principais fragmentos foram registados, de forma a seleccionar as melhores condições para o modo SIM, estes foram selecionados de acordo com a sua abundância relativa e ainda com a consulta de literatura.

O injetor PTV foi arrefecido com ar comprimido no modo de injeção *solvent vent* (tempo de *vent*: 0,30 min 50 mL min⁻¹ pressão: 0,0 psi fluxo de purga: 60,0 mL min⁻¹, tempo 2 min), tendo a

temperatura sido programada desde 80 °C (0,45 min) até 280 °C (600 °C min⁻¹, 3 min isotérmica) O volume e a velocidade de injeção foi 10 µL e 100 µL min⁻¹, respetivamente. A fase móvel utilizada foi hélio mantido no modo de pressão constante (9,82 psi). A temperatura do forno foi programada desde 80 °C (durante 1 min) e depois até 240 °C (20 °C min⁻¹, durante 5 min) seguida para 245 °C (1 °C min⁻¹) e por fim até 300 °C (20 °C min⁻¹) com tempo de corrida de 21,75 minutos.

A temperatura da linha de transferência foi 280 °C, a temperatura da fonte do quadrupólo foi 150 °C e a temperatura da fonte de ionização foi 230 °C. Foi selecionado um *solvent delay* de 7 min. Foi usada ionização eletrónica (70 eV) numa gama de massa compreendida entre 35 e 550 Da, no modo de varrimento contínuo (*full scan*), com corrente de ionização de 34,6 µA e um potencial multiplicador de 1200 V.

No modo SIM, vários grupos de iões alvo foram monitorizados numa janela de tempo definida pela retenção correspondente, mantendo o *dwell time* em 100 ms.

3.3.3. Calibração instrumental

A partir da solução de 100,0 mg/L da mistura de TCAs e da solução de 10,0 mg/L de IS preparou-se uma solução com concentração de 10,0 mg/L de TCAs e 1,0 mg/L de IS em MeOH. Através de sucessivas diluições desta solução mistura (juntando 50:50, v:v da solução anterior e da solução de 1,0 mg/L, de maneira a ir diluindo a solução de TCAs mas mantendo a concentração constante de IS) obtiveram-se padrões que foram injetados no sistema cromatográfico. Assim os limites de deteção (LOD, do inglês *limit of detection*) e de quantificação (LOQ, do inglês *limit of quantitation*) instrumentais foram determinados a partir da injeção sucessiva de padrões de calibração diluídos e calculados com recurso à razão sinal/ruído (S/N) 3:1 e 10:1, respetivamente.

Para o estudo da linearidade e construção das respetivas curvas de calibração, prepararam-se soluções com onze níveis de concentração (250; 125; 62,5; 31,3; 15,6; 7,8; 3,9; 2,0; 1,0; 0,5; 0,2 µg/L). Estes padrões foram preparados a partir das soluções de 100,0 mg/L da mistura de TCAs e da solução de 10,0 mg/L de IS. Todos os estudos foram efetuados em triplicado.

3.3.4. Preparação dos dispositivos BAµE

A utilização da técnica BAµE implica a preparação dos dispositivos de microextração. Estes foram feitos em laboratório de acordo com trabalhos anteriores [57,58]. Consistiam em cilindros plásticos de PP, com cerca de 10 mm de comprimento de 3 mm de diâmetro, revestidos de fita adesiva, onde é colocado o material adsorvente. Vários materiais adsorventes foram testados desde carvão ativado a diversos polímeros. Quando se tornou possível o uso de dispositivos BAµE de nova geração e após estudos que mostravam a equivalência de recuperações entre os dois tipos, utilizou-se uma nova geração de dispositivos BAµE, para os restantes ensaios. Esta foi preparada de forma semelhante, mas com a diferença do suporte ser em *nylon* flexível, assim as suas dimensões são 10 mm de comprimento e 1 mm de diâmetro. Tal como descrito em trabalhos anteriores [59].

Antes de qualquer utilização estes eram limpas sob agitação em água ultrapura, durante 10 minutos, repetindo o processo pelo menos duas vezes, e depois secas com papel com o auxílio de uma pinça [57–59].

3.3.5. Ensaios de otimização

Para os ensaios de otimização foram efetuados ensaios de extração colocando 5 mL de água ultrapura num frasco de vidro apropriado e fortificando com 100 μ L da solução mistura de TCAs com concentração de 500,0 μ g/L, de forma a obter uma concentração final de 10,0 μ g/L, colocando-se também a barra de agitação e o dispositivo de microextração com o adsorvente selecionado. A microextração foi promovida por meio da agitação da barra magnética durante um determinado período, a uma dada velocidade, à temperatura ambiente. Após a extração, o dispositivo de microextração é retirado do frasco e seco em papel. Num *vial* contendo um *insert* de vidro foi colocado 90 μ L do solvente orgânico, para depois se proceder à retroextração. A retroextração é feita através do tratamento ultrassônico durante determinado tempo. É ainda adicionado 10 μ L de IS de concentração 10,0 mg/L, seguiu-se a utilização do vórtex durante 10 segundos e apenas depois o dispositivo de microextração foi retirado e o *vial* selado com auxílio de um encapsulador. No caso dos dispositivos de microextração em suporte de *nylon* não é necessário retirar o mesmo do *vial*.

Foram ainda realizados ensaios em branco usando água ultrapura onde a fortificação com a mistura de TCAs foi substituída por fortificação com MeOH. Todos os ensaios foram efetuados em triplicado.

Por fim colocaram-se os *vials* no amostrador automático para posterior análise por GC-MS. É possível observar um esquema do procedimento experimental resumido na Figura 3.1.

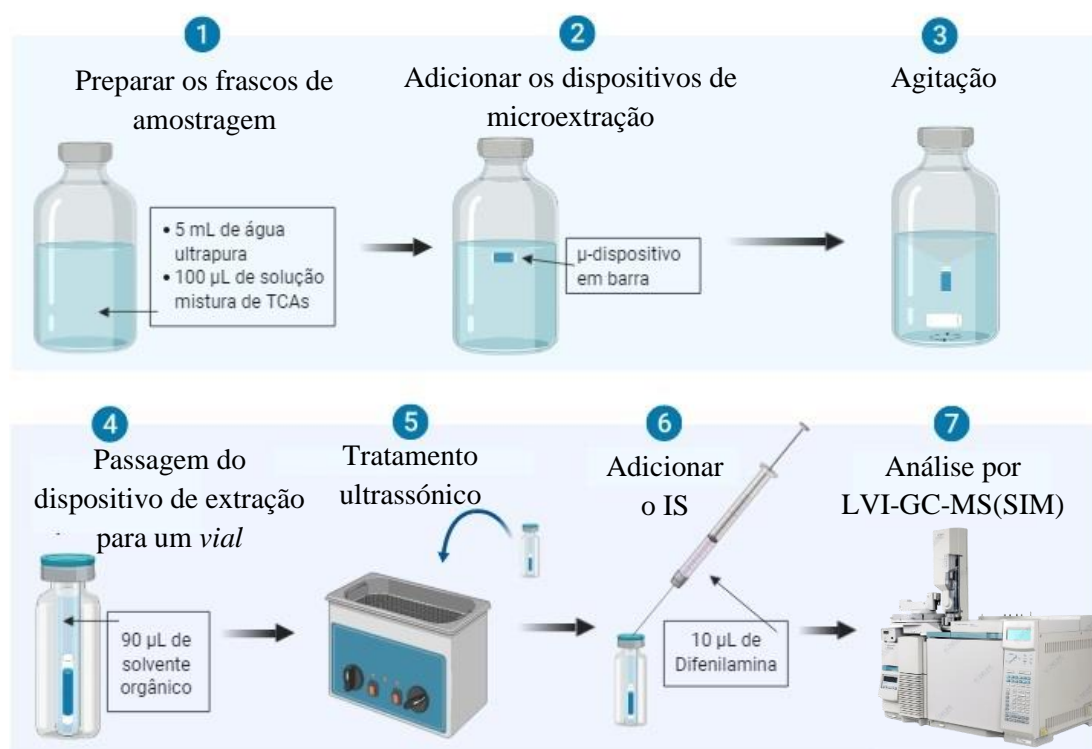


Figura 3.1 - Representação esquemática do procedimento experimental para a otimização incluindo, a extração, posterior retroextração, seguida de análise.

Foram estudados diversos parâmetros para a otimização do processo, nomeadamente, o solvente para dessorção (MeOH, ACN e MeOH/ACN 50% (v/v)), o tempo de dessorção (15, 30 e 45 min), a velocidade de agitação (750, 990 e 1250 rpm), o pH da matriz (2,0; 5,5; 8,0; e 12,0), o modificador orgânico (0, 5, 10, 15 e 20 % em MeOH, v:v) e a força iônica (0, 5, 10, 15 e 20 % em NaCl, p:v) da matriz, o tempo de equilíbrio (1, 2, 3, 5, e 16h), e ainda o volume da amostra (1,5; 5; 10; 25; 40 mL). Os parâmetros anteriores foram os escolhidos de acordo com trabalhos anteriores [36,57–66].

Por forma a otimizar a eficiência da extração os parâmetros acima referidos foram estudados seguindo uma estratégia de otimização univariável. Esta é utilizada pela maioria dos trabalhos envolvendo BAμE. Nesta abordagem, todas as variáveis, exceto uma, estão fixadas, e o comportamento do sistema é estudado a vários níveis dessa mesma variável. As desvantagens deste método são a necessidade de muitas experiências e a impossibilidade de identificar interações entre as variáveis em estudo. Apesar de alguns autores incentivarem o uso de novas estratégias outros defendem que esta poderá ser utilizada neste tipo de otimizações dado que o número de variáveis é relativamente baixo e não são esperadas interações significativas entre estas [36,67].

O cálculo das recuperações foi feito por comparação das áreas dos picos obtidos em cada ensaio com as dos picos das áreas dos padrões de controlo, este cálculo está explicado no Anexo 2.

3.3.6. Validação do método e análise de amostras reais

As amostras de urina foram hidrolizadas antes de serem utilizadas. Este processo foi efetuado tal como indicado em estudos anteriores, com apenas algumas adaptações [19]. Num balão de vidro, adicionou-se 1 mL de urina, 200 μL de uma solução de NaOH 10M. O balão de vidro foi colocado no rotavapor durante 10 mins a 60 °C. O conteúdo do balão foi de seguida transferido para tubos de Falcon (de 10 ou 50 mL consoante a quantidade de amostra a ser hidrolizada), e centrifugado durante 10 mins a 2000 rpm. Após a centrifugação o sobrenadante foi transferido para outros tubos de Falcon, sob tratamento ultrassónico durante 5 mins e por fim filtrada por um filtro de seringa nylon 25 mm-0,45 μm.

Para validação do método, em cada ensaio juntou-se 1,2 mL de urina com 3,8 mL de solução tampão (Na₂HPO₄) para o pH final ser 12 (pH ajustado com uma solução de HCl 5M) com 5% de NaCl em frascos de vidro apropriados e fortificados com 100 μL da solução mistura de TCAs com concentração desejada. Seguindo-se o procedimento descrito anteriormente sob condições experimentais otimizadas. Ensaio em branco foram igualmente realizados com amostras reais utilizando o mesmo processo sem fortificação dos padrões.

Para os estudos de validação do método em urina, diversos parâmetros foram avaliados, tais como linearidade, sensibilidade, seletividade, exatidão, precisão, recuperação, efeitos de matriz e eficiência do processo, de acordo com estudos anteriores [14,29,55,68]. Todos os ensaios de validação foram efetuados em triplicado, salvo exceções referidas.

Para avaliar a seletividade do método, verificou-se a inexistência de interferentes nos mesmos tempos de retenção de cada analito, aplicando o método BAμE-LD/LVI-GC-MS otimizado, a amostras branco [55].

As amostras de calibração foram preparadas na gama de 10,0 – 1000,0 μg/L para a urina, e foram analisadas com o método proposto. A linearidade foi estimada utilizando o teste *lack-of-fit*, e verificando os respetivos coeficientes de determinação (r^2) e a dispersão de resíduos [14,55].

Para a determinação da exatidão e precisão, intra e inter-dias, foram efetuados ensaios fortificando amostras branco com os analitos alvo com concentrações iguais ao limite de quantificação inferior (LLOQ, do inglês *lower limit of quantification*), e também a níveis de concentração baixos, médios e altos. Para as amostras de urina foram utilizados os seguintes valores 10, 50, 500 e 1000 µg/L. Os ensaios foram efetuados seis vezes. Os ensaios inter-dia foram avaliados em três dias consecutivos. O critério de aceitação para a exatidão e precisão foi que os valores residuais relativos e os desvios padrão relativos (RSDs, do inglês *relative standard deviations*) deveriam ser $\leq 15 \%$, exceto para os valores de LLOQ onde foram aceites valores $\leq 20 \%$ [14,55,68].

A sensibilidade foi verificada pelos LOD e LLOQ. O primeiro corresponde a uma razão sinal/ruído (S/N) de 3:1. Enquanto o LLOQ é a concentração mais baixa a que é possível quantificar de acordo com os parâmetros da precisão e da exatidão, é utilizado como o primeiro ponto da reta de calibração e, corresponde a uma razão sinal/ruído < 10 [14,29,55].

Os ensaios para os efeitos de matriz e as recuperações médias foram efetuados preparando três conjuntos de amostras (o conjunto A, B e C), para dois níveis de concentração. Para a urina foram utilizadas as concentrações, 25,0 e 750,0 µg/L. Depois foram analisadas de acordo com o método otimizado e as áreas dos picos absolutas dos analitos foram utilizadas para determinar os parâmetros referidos. O conjunto A (n=6) consiste em misturas de padrão com as concentrações anteriormente referidas. O conjunto B (n=6) e o C (n=6) foram preparados utilizando seis amostras de cada tipo de matriz. As amostras no conjunto B foram fortificadas após a microextração (antes da LD). As amostras no conjunto C foram fortificadas antes da microextração. A razão da área absoluta dos picos entre os conjuntos A e B foi utilizada para calcular os efeitos de matriz. A razão da área absoluta dos picos entre os conjuntos B e C foi utilizada para calcular as recuperações. A razão da área absoluta dos picos entre os conjuntos A e C foi utilizada para calcular a eficiência do processo. Sendo que as equações utilizadas estão descritas, respetivamente, nas equações 3.1, 3.2, e 3.3 [14,29,55,68].

$$\text{Efeito de matriz} = \frac{A_{\text{relativa}} \text{ do pico da solução do conjunto B}}{A_{\text{relativa}} \text{ do pico da solução do conjunto A}} \times 100 \quad 3.1$$

$$\text{Recuperação média} = \frac{A_{\text{relativa}} \text{ do pico da solução do conjunto C}}{A_{\text{relativa}} \text{ do pico da solução do conjunto B}} \times 100 \quad 3.2$$

$$\text{Eficiência do processo} = \frac{A_{\text{relativa}} \text{ do pico da solução do conjunto A}}{A_{\text{relativa}} \text{ do pico da solução do conjunto C}} \times 100 \quad 3.3$$

4. Discussão de Resultados

No presente trabalho foram estudados os seguintes antidepressivos: cloridrato de amitriptilina (AMT), cloridrato de mianserina (MIA), trimipramina (TRI), cloridrato de imipramina (IMP), mirtazapina (MIR) e o cloridrato de dosulepina (DOT), é possível observar as estruturas dos mesmos na Figura 4.1. As suas propriedades físicas e químicas estão descritas na

Tabela 4.1. Existe um vasto número de TCAs à venda em Portugal, estes 6 foram escolhidos como modelos desta classe de medicamentos.

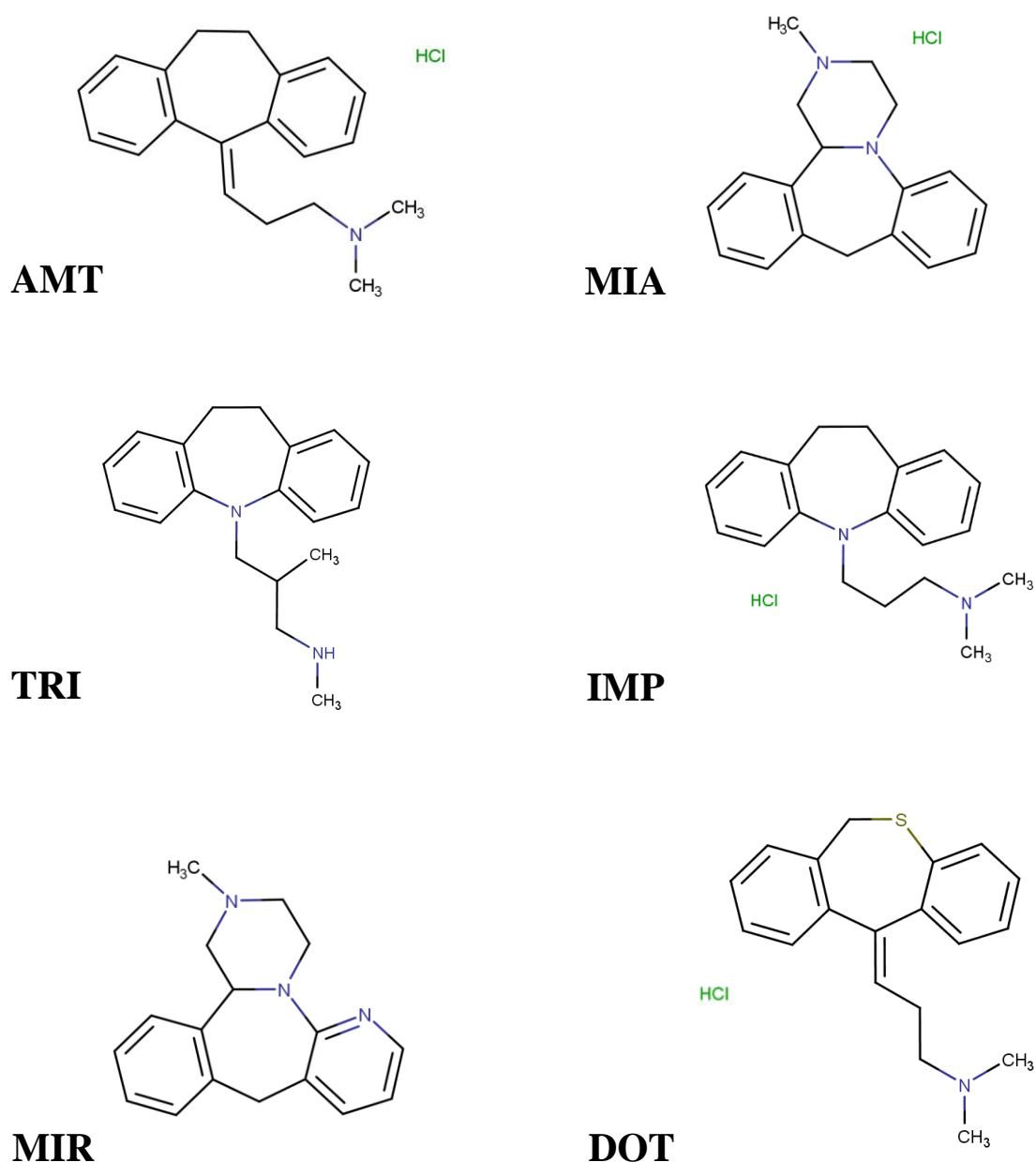


Figura 4.1 - Estruturas dos Antidepressivos em estudo: Cloridrato de amitriptilina (AMT), Cloridrato de mianserina (MIA), Trimipramina (TRI), Cloridrato de imipramina (IMP), Mirtazapina (MIR) e Cloridrato de dosulepina (DOT)

Tabela 4.1 - Propriedades físicas e químicas dos TCAs selecionados para o trabalho.

Nome	Nome em inglês	Fórmula química	Peso molecular (g/mol)	Constante de dissociação ácida (pK_a) ¹	Log $K_{O/W}$ ¹
Cloridrato de amitriptilina	Amitriptyline hydrochloride	$C_{20}H_{23}N \cdot HCl$ [69]	313,87 [69]	9,76	4,81
Cloridrato de mianserina	Mianserin hydrochloride	$C_{18}H_{20}N_2 \cdot HCl$ [11]	300,8 [11]	6,92	3,83
Trimipramina	Trimipramine	$C_{20}H_{26}N_2$ [11]	294,4 [11]	0,29 / 10,15	4,37
Cloridrato de imipramina	Imipramine hydrochloride	$C_{19}H_{24}N_2 \cdot HCl$ [70]	316,87 [70]	0,19 / 9,20	4,28
Mirtazapina	Mirtazapine	$C_{17}H_{19}N_3$ [12]	265,35 [12]	5,36 / 6,67	3,21
Cloridrato de dosulepina	Dothiepin hydrochloride (ou Dosulepin hydrochloride)	$C_{19}H_{21}NS \cdot HCl$ [11]	313,9 [11]	9,76	4,52

O composto escolhido para IS deve ter certas características, enumeradas em 1.7.1, para ser um IS adequado. Para este trabalho o IS escolhido foi a difenilamina (DIF), representada na Figura 4.2. Esta foi escolhida devido à sua estrutura química que inclui anéis aromáticos e um átomo de azoto (similar aos compostos em estudo), e à pouca probabilidade de ser encontrada nas matrizes analisadas. A difenilamina é principalmente utilizada como composto estabilizante em propulsores de mísseis e em explosivos que contenham nitrocelulose, e para além da utilização militar pode ser utilizada para prevenir a deterioração de colheitas aquando do seu armazenamento, pode ser utilizada como antioxidante para polímeros e elastômeros, e no isolamento da borracha. Existem ainda outras utilizações menos frequentes como estabilizador de perfumes, entre outras [71].

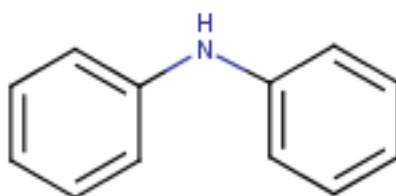


Figura 4.2 - Estrutura da difenilamina.

¹ Informações retiradas do *software* MarvinView da Chemaxon.

4.1. Otimização das condições instrumentais

O passo inicial deste trabalho foi estabelecer as condições instrumentais adequadas para os analitos em estudo. Para proceder à identificação de compostos no GC-MS existem parâmetros fundamentais, como o tempo de retenção (t_R) e o espectro de massa característico de cada composto. Para tal analisou-se uma solução mistura com igual concentração de cada TCA em modo *full scan*. Isto permitiu identificar os picos correspondentes a cada analito e também obter os espectros de massa de cada um, que podem ser observados no Anexo 3. Assim foram selecionados os iões alvo e os principais fragmentos para se alcançar melhor seletividade e sensibilidade para operação no modo SIM, estes podem observar-se na Tabela 4.2, onde os picos destacados a negrito são os iões alvo, e com asteriscos são os picos base. Na Tabela 4.2 é também possível observar-se os tempos de retenção de cada analito. Os iões a monitorizar escolhidos, estão de acordo com diversos artigos consultados [20,72–74].

Tabela 4.2 - Iões selecionados no modo SIM para cada TCA. Iões alvo assinalados a negrito. Picos base assinalados com *.

TCA	Iões SIM (m/z)	t_R (min)
AMT	58* /202/215	12,9
MIA	193* /220/264	13,1
TRI	58* /249/294	13,2
IMP	58/ 234* /280	13,3
MIR	195* /208/265	13,8
DOT	58* /202/295	16,0

De seguida, adaptou-se o método para LVI-GC/MS (SIM) o que nos permitiu obter o cromatograma exemplo como o apresentado na Figura 4.3. É possível observar que em *full scan* os picos correspondentes à MIA, TRI e IMP, não estão totalmente resolvidos, mas tal não é problemático dado que são utilizados três iões alvo diferentes no modo SIM.

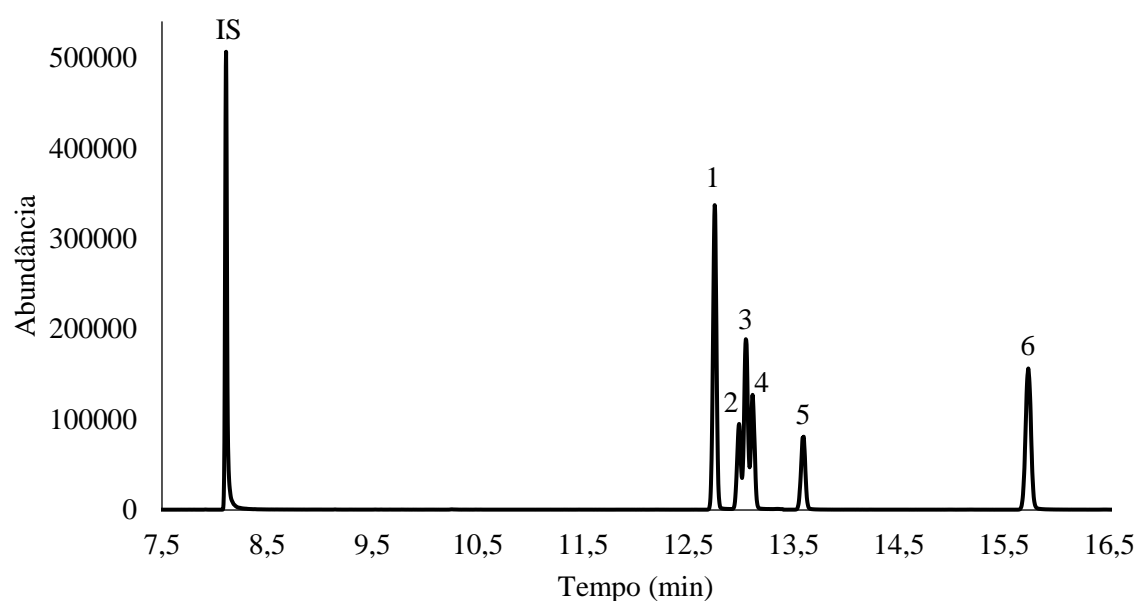


Figura 4.3 - Cromatograma obtido por LVI-GC-MS(SIM) relativo aos antidepressivos estudados em condições instrumentais otimizadas. (PI 1000 µg/L; TCAs 600 µg/L) (1- AMT; 2- MIA; 3- TRI; 4- IMP; 5- MIR; 6-DOT).

4.1.1. Calibração instrumental

O LOD e o LOQ foram determinados a partir da injeção sucessiva de padrões de calibração diluídos e calculados com recurso à razão sinal/ruído (S/N) 3:1 e 10:1, respetivamente. O LOD obtido foi 0,5 µg/L e o LOQ obtido foi 1,65 µg/L.

A linearidade da gama dinâmica de trabalho foi avaliada com recurso ao método dos mínimos quadrados, tendo as regressões lineares sido aplicadas no intervalo de concentrações compreendidas entre 2,4 e 2500 µg/L (envolvendo onze níveis de concentrações, cada uma analisada em triplicado), verificando-se boa linearidade ($r^2 \geq 0,9958$).

4.2. Seleção do material Sorvente para BAµE

Após estabelecidos os parâmetros instrumentais, seguiu-se a seleção do sorvente mais adequado para os compostos em estudo.

Os ensaios para a otimização efetuados em condições experimentais convencionais (5 mL de água ultrapura fortificada com 100 µL de solução mistura de TCAs com concentração de 500,0 µg/L microextração: 3h (990 rpm), pH 5,5; retroextração: 90 µL de MeOH, 30 min sob tratamento ultrassónico).

Inicialmente foram estudados quatro ACs gentilmente cedidos pela Professora Doutora Elina B. Caramão do Laboratório de Biotecnologia Industrial da Universidade de Tiradentes no Brasil, com o objetivo de descobrir mais utilizações para os mesmos. Observando o gráfico da Figura 4.4 é possível verificar que nenhum AC apresenta boas recuperações para qualquer dos analitos alvo. Sendo que apenas permite obter recuperações inferiores a 9 %. Foi também possível observar que havia inconsistência nos valores do padrão interno, talvez devido a possíveis adsorções irreversíveis por parte dos sorventes em causa. Os ACs são materiais sólidos porosos que retêm solutos por mecanismos eletrostáticos e/ou dispersivos, de acordo com as propriedades adsorptivas texturais, a área superficial e a dimensão dos poros. A carga superficial predominante à superfície do AC, depende do pH da solução onde este se encontra, ou seja, será positiva se o pH for inferior ao pH_{PZC} (o valor de pH no ponto de carga zero), e será negativa se o pH for superior ao pH_{PZC} . Assim, esta pode ser a razão da fraca capacidade de recuperação, dado que o valor mais perto do pH da solução (AC 3, pH_{PZC} 5,9) é o que mostra melhores resultados. A elevada área superficial não parece ser suficiente para bons resultados de recuperação, dado que todos se encontram parcialmente carregados positivamente. Isto pode condicionar as interações eletrostáticas com os analitos em estudo. Outro possível problema será o pequeno tamanho da maioria dos poros em todos os ACs ($< 20 \text{ \AA}$) [38,56,75].

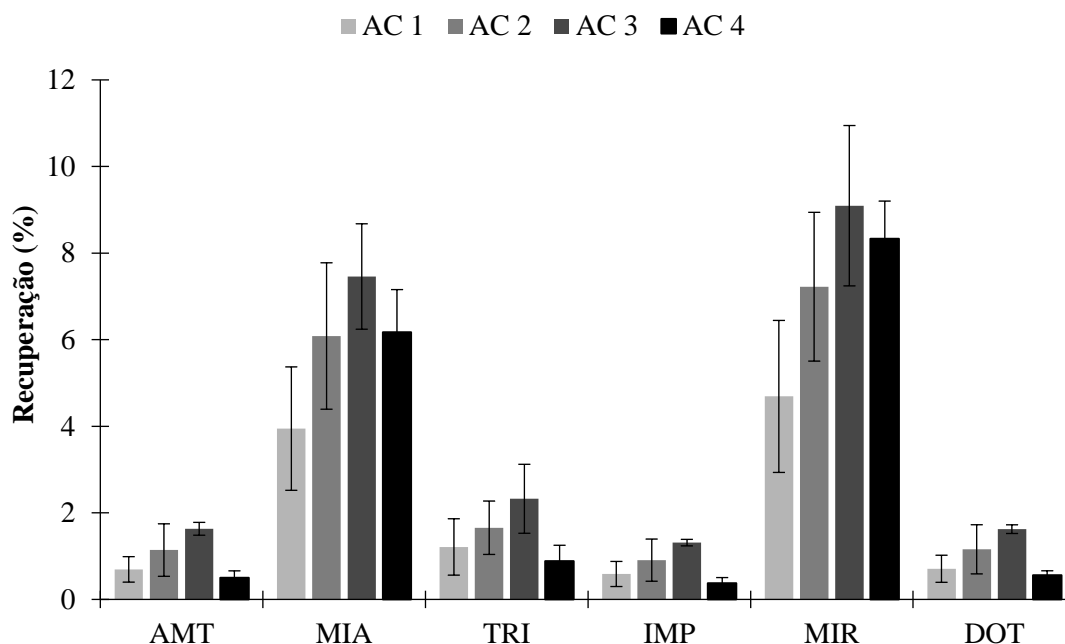


Figura 4.4 - Efeito da seletividade dos ACs para o enriquecimento dos TCAs em estudo em água ultrapura, obtido por BA μ E- μ LD/LVI-GC-MS(SIM). Condições do ensaio: 5 mL de água ultrapura fortificada com 100 μ L de solução mistura de TCA com concentração de 500,0 μ g/L; microextração 3 h (990 rpm), pH 5,5; retroextração: 90 μ L de MeOH, 30 min sob tratamento ultrassônico.

Após a observação da fraca capacidade de recuperação dos ACs uma hipótese poderia ser o facto da dessorção não ser efetiva, ou seja, estes ficariam nos ACs e o processo de retroextração teria pouco efeito. Com o intuito de esclarecer esta questão, foi efetuado um ensaio em condições ligeiramente diferentes ao anterior recorrendo a 5 mL de água ultrapura fortificada de forma a obter uma concentração final de 500,0 μ g/L de mistura de TCAs (ao invés de 10,0 μ g/L, a concentração utilizada nos outros ensaios). Após o processo de extração, retirou-se parte da solução que está no *vial* de vidro e adicionou-se diclorometano (50:50, v:v). Depois, a solução foi colocada em vórtex, seguindo-se 5 min de ultrassons, 5 min de centrifugação a 2000 rpm, e sendo analisada a fase orgânica. O resultado deste estudo pode ser observado no gráfico da Figura 4.5. Constata-se que três ACs (AC1, AC2 e AC4) apresentam elevada capacidade adsorptiva para os seis TCAs em estudo. Contudo, o AC3 evidencia baixa capacidade para os compostos alvo estudados. Assim é possível concluir que o processo de LD adotado não é efetivo de todo, sendo possível serem realizados estudos adicionais para a melhoria desta etapa, uma vez que os ACs retêm fortemente os TCAs. Apesar de o AC3 não ter evidenciado capacidade para extrair os compostos alvo, foi o material que evidenciou maior capacidade para remover Cu²⁺, seguido do AC2, conforme ficou demonstrado no estudo previamente efetuado [56].

É então possível concluir-se que os AC1, AC2 e AC4 são muito efetivos como potenciais materiais adsorventes para TCAs, podendo ser utilizados noutros domínios, nomeadamente, em processos de descontaminação ou remoção de diversos tipos de contaminantes de águas, como por exemplo, em ETARs justificam-se estudos adicionais quer com outro tipo de compostos orgânicos quer inorgânicos, no sentido de verificar a verdadeira dimensão da capacidade adsorptiva dos ACs em questão.

Seguiu-se o desenvolvimento deste método analítico utilizando polímeros como fase sorvente.

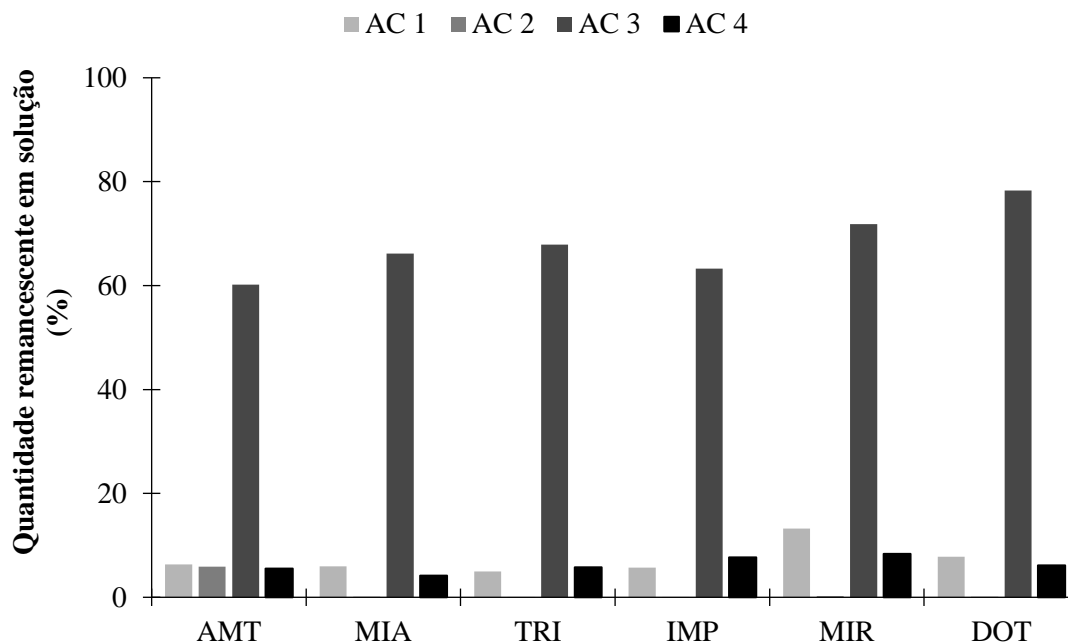


Figura 4.5 - Quantidade de TCAs que permanecem em solução após microextração usando diferentes ACs como fase sorventes. Condições do ensaio: 5 mL de água ultrapura fortificada com 25 μ L de solução mistura de TCA com concentração de 100 mg/L; microextração 16h (990 rpm), pH 5,5; análise realizada por LVI-GC-MS(SIM).

Ao contrário dos ACs anteriormente estudados, os materiais baseados em polímeros podem reter os compostos por interações do tipo fase-reversa, nomeadamente por interações π - π e hidrofóbicas. Por outro lado, alguns polímeros permitem reter compostos por interações dipolo-dipolo e iônicas, assim como por ligações de hidrogénio, dependendo do tamanho de partícula, e da área superficial. Os sorventes do tipo silicone são caracterizados por interações hidrofóbicas, onde o mecanismo de retenção predominante são forças de Van-der-Waals [38,75].

Foram escolhidos seis polímeros com diferentes características entre si por forma a avaliar os possíveis resultados com diferentes sorventes. Ao testar os polímeros como fase sorvente foi possível observar um desempenho muito superior ao dos ACs. No gráfico da Figura 4.6, é possível observar as recuperações médias utilizando polímeros sendo notória uma grande variação na capacidade de recuperação dos polímeros, sendo que alguns ultrapassam os 50 % de recuperação média, enquanto outros não atingem os 10 %. As estruturas de todos os polímeros utilizados encontram-se na Figura 4.7. Os melhores resultados são obtidos com o C18 e o Strata CN. Estes resultados são expectáveis embora sejam polímeros com estruturas bastante diferentes, o C18 devido à sua extensa cadeia alifática gera interações hidrofóbicas, enquanto que o Strata CN está mais envolvido em interações dipolo-dipolo. Assim seria de esperar que os TCAs devido à sua cadeia alifática sejam retidos por interações hidrofóbicas, como seria de prever com o C18, contudo o Strata CN também é bem-sucedido na sua retenção pois os TCAs apresentam elementos eletronegativos, como o azoto e o enxofre que confere polaridade às moléculas permitindo a interação com o grupo CN deste polímero. O Strata DVB, o SX, e o HLB de forma geral têm um desempenho semelhante entre si. O Strata DVB é um polímero de estireno-divinilbenzeno assim, poderá favorecer interações hidrofóbicas e π - π , no entanto não parece ser eficaz, isto deve-se provavelmente porque os grupos polares nos compostos dificultam este tipo de interações. O mesmo raciocínio pode ser utilizado para o SX e para o HLB, embora estes tenham capacidade de reter compostos com alguma polaridade devido à presença do grupo pirrolidónico, não

parecem ser eficazes para a microextração destes compostos possivelmente devido à ionização dos mesmos no pH a que se efetuou este estudo (tal como visível no Anexo 4), o que previne possíveis interações com os mesmos. Para o DVB Merck era expectável observar resultados similares aos dos polímeros anteriores, pois tem estrutura química semelhante, mas tal não se verifica, segundo o fabricante as partículas deste polímero são irregulares, podendo esta característica dificultar a microextração. Para os últimos quatro polímeros referidos o caso de os resultados não serem os melhores poderá dever-se ao facto da retroextração não ocorrer por completo, assim decidiu-se testar mais dois tipos de solvente para a microdessorção líquida por forma a obter melhores resultados com os mesmos.

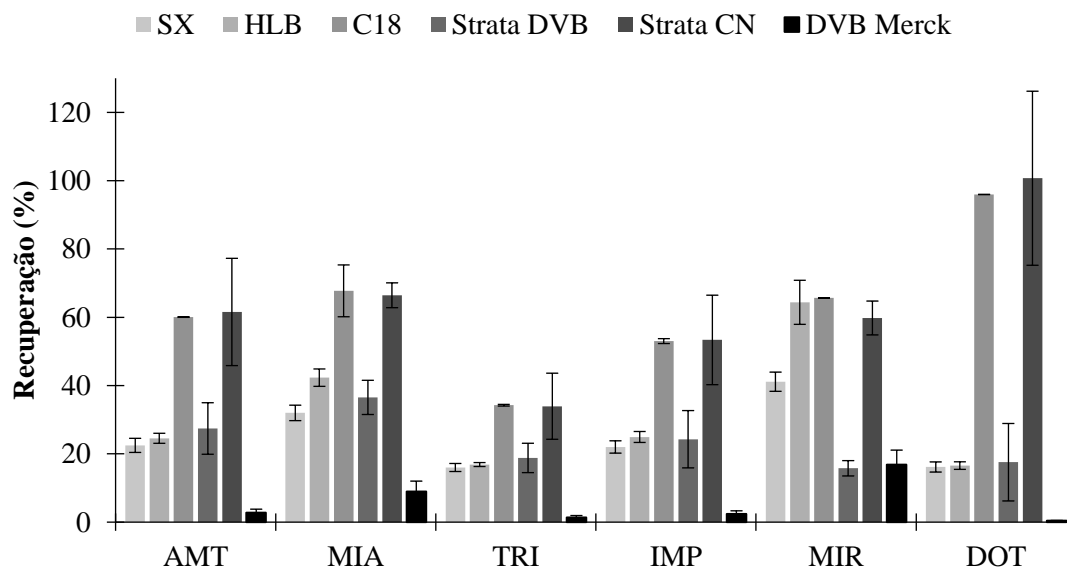


Figura 4.6 - Efeito da seletividade dos polímeros para o enriquecimento dos TCAs em estudo em água ultrapura, obtido por BAμE-μLD/LVI-GC-MS(SIM). Condições do ensaio: 5 mL de água ultrapura fortificada com 100 μL de solução mistura de TCA com concentração de 500,0 μg/L; extração 3h (990 rpm), pH 5,5; retroextração: MeOH, 30 min sob tratamento ultrassónico.

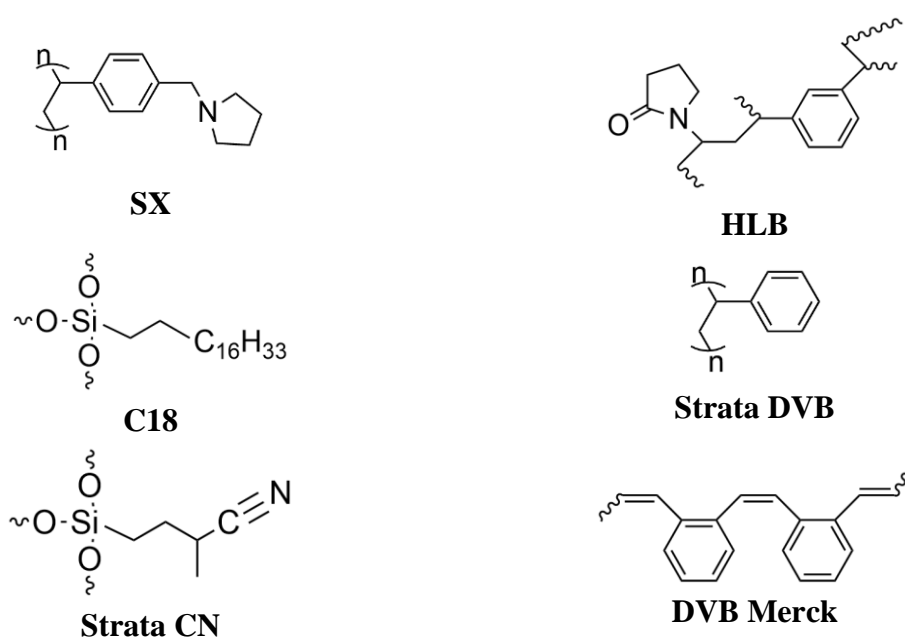


Figura 4.7 - Estruturas dos polímeros utilizados como fase sorvente.

4.3. Processo de otimização

No sentido de avaliar a influência de diversos parâmetros experimentais, foram estudados os seus efeitos tanto a nível de extração como da retroextração. Os parâmetros estudados para a otimização do processo já foram anteriormente referidos, sendo o solvente para dessorção, o tempo de dessorção, a velocidade de agitação, o pH, o modificador orgânico, a força iónica da matriz, o tempo de equilíbrio e, ainda, o volume da amostra. E como mencionado na parte experimental estes foram estudados seguindo uma estratégia de otimização univariável.

4.3.1. Otimização da retroextração

O processo de retroextração foi efetuado com recurso à LD. Um dos parâmetros mais importantes deste passo é o solvente utilizado, a primeira variável otimizada. Neste método utilizou-se ultrassons para acelerar a LD, o que será também otimizado. Pode ser combinada com GC, neste caso deverá ser escolhido LVI dado que assim, a maior parte do extrato desadsorvido pode ser injetado na coluna cromatográfica, aumentando a sensibilidade do método [36].

4.3.1.1. Efeito do tipo de solvente

Durante este passo, o dispositivo de microextração é imerso num solvente ou numa mistura de solventes para a dessorção dos solutos extraídos. O mínimo de solvente deve garantir a completa imersão da barra de microextração, e os solventes deverão ser compatíveis com o polímero. O solvente deverá ser capaz de retirar todos os analitos da fase sorvente. Os solventes de dessorção mais comuns são ACN, MeOH, misturas entre ambos, e podem ainda ser utilizados misturas com água ou soluções tampão [36,59].

No gráfico da Figura 4.6 foi possível observar as recuperações quando utilizado MeOH como solvente. Assim o passo seguinte foi estudar o efeito de utilizar ACN e MeOH:ACN (50:50, v:v) como solventes, as recuperações médias obtidas podem ser observadas nos gráficos da Figura 4.8. Os resultados obtidos mostram que utilizando a mistura MeOH:ACN como solvente de retroextração é possível obter os melhores resultados, comparativamente com ambos os solventes individualmente. Assim a mistura foi a selecionada como solvente para a retroextração em todos os ensaios posteriores.

Quanto aos polímeros estudados, houve uma clara melhoria das recuperações médias, em particular com o SX, HLB, e Strata DVB, utilizando o ACN e a mistura MeOH:ACN, continuando a verificar-se que o DVB Merck apresenta baixos níveis de recuperação, com exceção nos compostos MIR e MIA quando se utiliza MeOH:ACN, o que se poderá dever à ligeira diferença na estrutura química destes compostos em relação aos demais (tetracíclicos), mesmo assim o seu desempenho não é o melhor. De acordo com as recuperações médias selecionou-se apenas três polímeros para prosseguir o trabalho. Os ensaios posteriores foram realizados utilizando apenas o SX, o C18, e o Strata CN, por mostrarem os maiores valores de recuperação na maioria dos analitos estudados, e pelo facto das estruturas químicas dos três polímeros serem diferentes, tornando-se importante observar como este facto afeta a extração dos compostos.

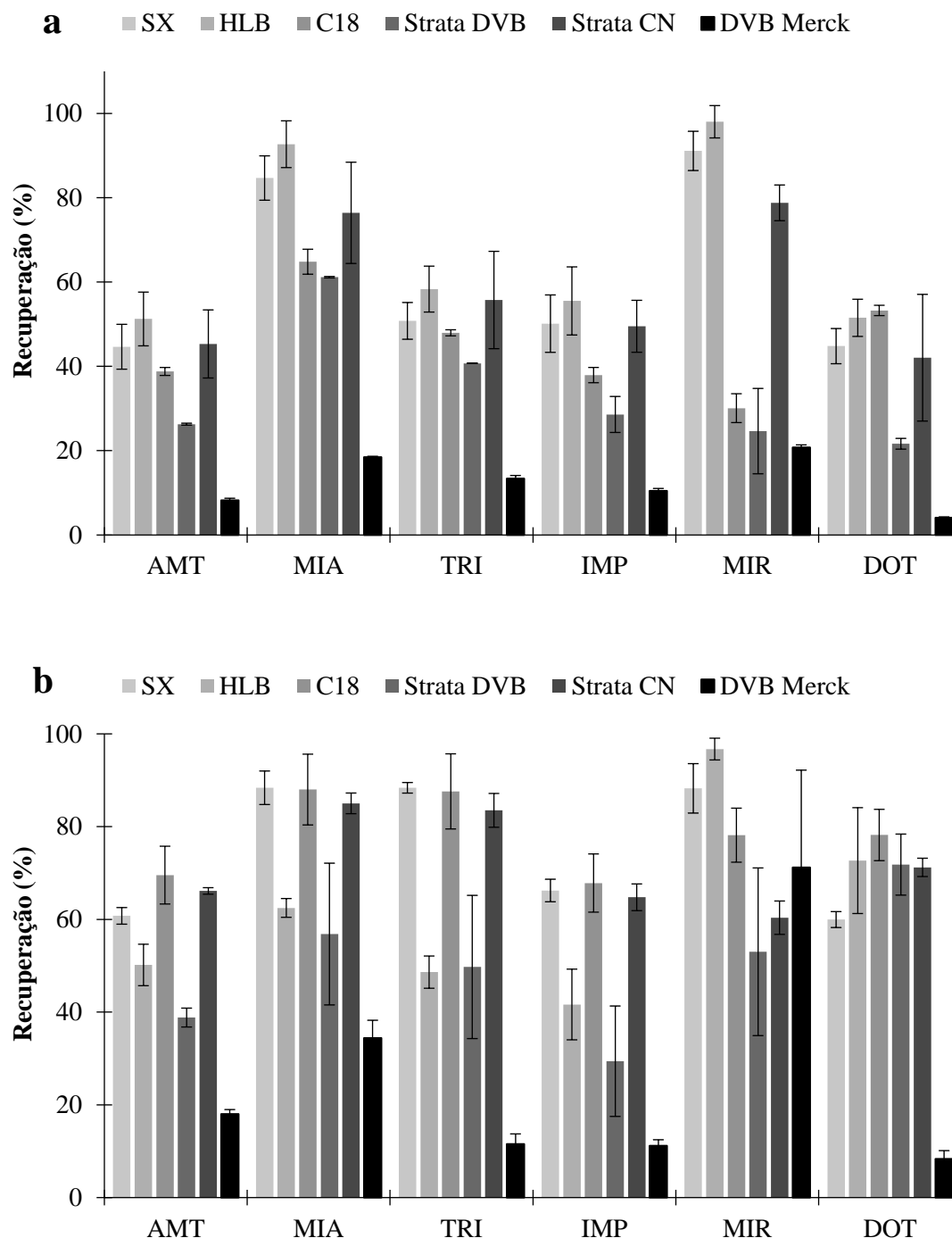
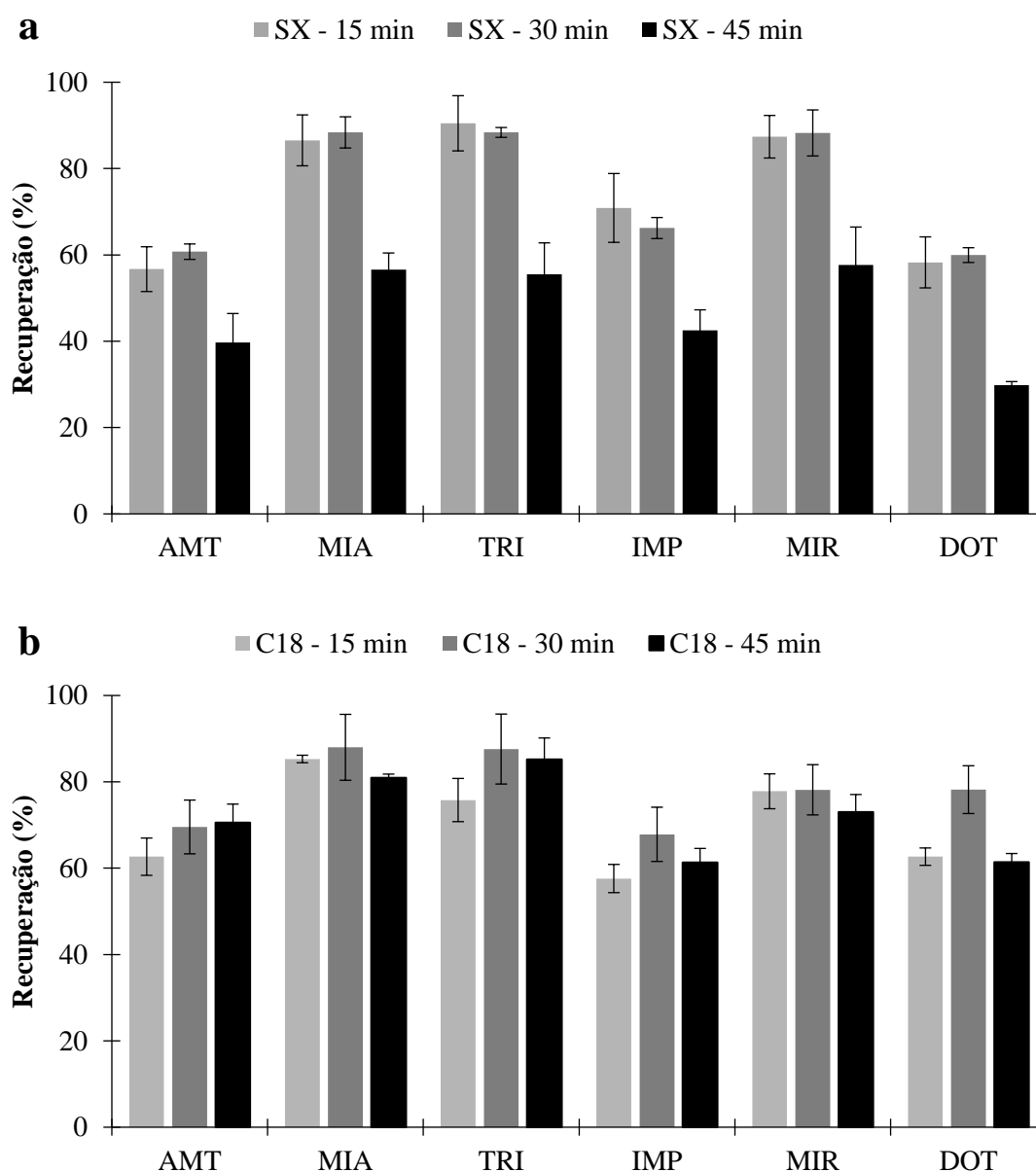


Figura 4.8 – a: Efeito do solvente para a LD no enriquecimento dos TCAs em estudo em água ultrapura, obtido por BA μ E- μ LD/LVI-GC-MS(SIM). a: ACN; b: MeOH:ACN. Condições do ensaio: 5 mL de água ultrapura fortificada com 100 μ L de solução mistura de TCA com concentração de 500,0 μ g/L; microextração 3 h (990 rpm), pH 5,5; retroextração: 90 μ L de ACN ou MeOH:ACN (50:50, v:v), 30 min sob tratamento ultrassônico.

4.3.1.2. Efeito do tempo de retroextração

Tal como referido anteriormente, o processo de retroextração pode ser acelerado, neste método utilizámos ultrassons para acelerar o processo, sendo também necessário otimizar este passo [36].

Foram estudados 15, 30 e 45 min de tratamento ultrassônico, com os polímeros SX, C18 e Strata CN. As recuperações médias podem ser observadas nos gráficos da Figura 4.9. Observou-se que para o SX 15 min são suficientes para quebrar a maioria das ligações entre os compostos e o dispositivo, enquanto que para o C18 e para o Strata CN foram necessários 30 min. Estas opções foram tomadas pois observando as recuperações obtidas para o SX aos 15 e aos 30 min, é possível concluir que estas são muito semelhantes e sendo assim a decisão recai em tornar o processo mais célere possível. Nas restantes fases sorventes comparando as recuperações obtidas aos 15 e aos 30 min é possível observar que há uma melhoria na maioria dos analitos com o aumento do tempo, o que nos leva a comparar os 30 e os 45 min. Nesta comparação é possível observar que com o aumento de tempo as recuperações são semelhantes ou chegam mesmo a piorar, esta diminuição poderá dever-se ao aumento da temperatura dos *vials* com o prolongamento do tratamento ultrassônico.



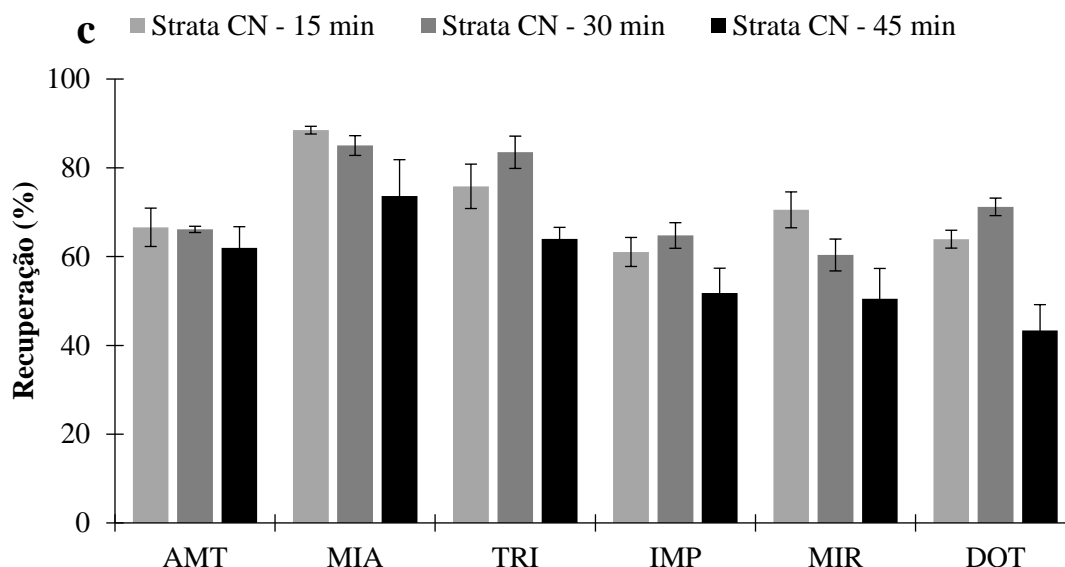


Figura 4.9 - Efeito do tempo de retroextração no enriquecimento dos TCAs em estudo em água ultrapura, obtido por BA μ E- μ LD/LVI-GC-MS(SIM). a: SX; b: C18; c: Strata CN. Condições do ensaio: 5 mL de água ultrapura fortificada com 100 μ L de solução mistura de TCA com concentração de 500,0 μ g/L; microextração 3 h (990 rpm), pH 5,5; retroextração: 90 μ L de MeOH:ACN (50:50, v:v), 15/30/45 min sob tratamento ultrassônico.

Após os ensaios efetuados relativos à retroextração prosseguiu-se o processo apenas com os sorventes SX e C18 por mostrarem melhores capacidades de recuperação, e não se mostrar necessário continuar a otimizar o processo com mais fases sorventes.

4.3.2. Otimização da microextração

O processo a ser otimizado compreende a colocação do dispositivo de microextração numa matriz aquosa para que este entre em contacto com os solutos. Como tal existem vários parâmetros que podem influenciar a eficiência deste processo, como a velocidade de agitação, o pH, o efeito da força iónica, a adição de um sal inerte (como o NaCl), a adição de um modificador orgânico (como o MeOH), o tempo de equilíbrio, e o volume da amostra. Variáveis como o pH ou a adição de um sal inerte, modificam os analitos ou as condições da amostra e afetam o equilíbrio, e outros, como a velocidade de agitação, aceleram o processo afetando a sua cinética [36].

4.3.2.1. Efeito da velocidade de agitação

O efeito da velocidade de agitação é essencial ser estudado pois pode acelerar o processo de extração. Contudo há também um lado negativo uma vez o aumento da velocidade de agitação poder causar danos à fase sorvente devido ao contacto direto entre a barra de microextração e o frasco onde se encontra a amostra, e também aumentar o erro. Enquanto alguns autores defendem que não há melhoria após 750 rpm, outros referem que velocidades de agitação mais elevadas, compreendidas entre 1000 a 1250 rpm, obtêm melhores resultados [36]. Neste sentido, foram testadas velocidade de agitação de 750, 990 e 1250 rpm, para as duas fases sorventes. Os resultados obtidos encontram-se representados nos

gráficos da Figura 4.10, mantendo todos os restantes parâmetros fixos. É possível observar que os resultados melhoram quando comparando 750 rpm com 990 rpm para ambos os polímeros. Levando-nos assim a concluir que há uma melhoria na recuperação com o aumento das rotações. Contudo para 1250 rpm é possível observar uma ligeira descida, observa-se experimentalmente que a dimensão do vórtex criado a 1250 rpm é demasiado elevada para os frascos de vidro utilizados, criando uma maior instabilidade. Assim prosseguiu-se a otimização mantendo os 990 rpm.

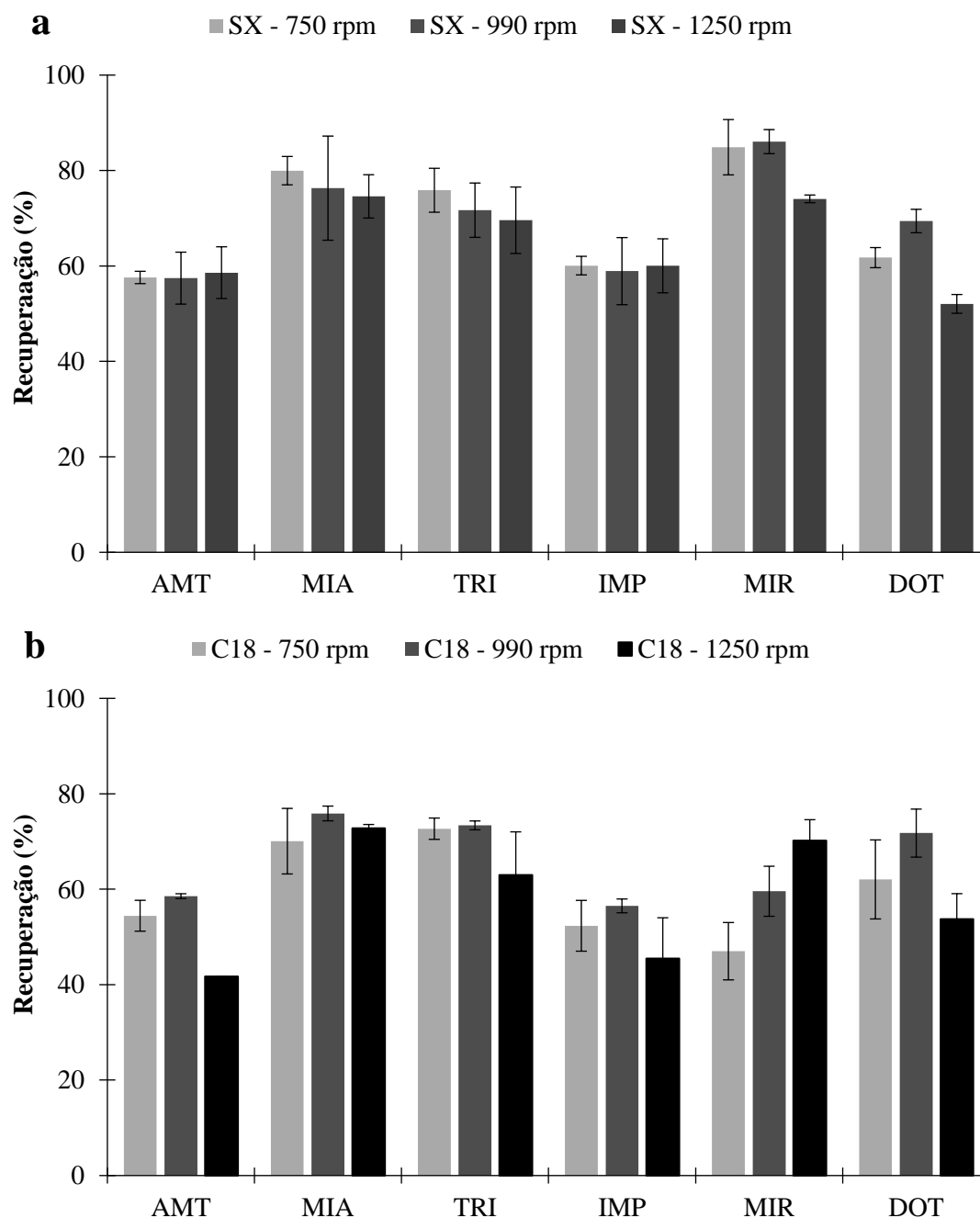


Figura 4.10 - Efeito da velocidade de agitação no enriquecimento dos TCAs em estudo em água ultrapura, obtido por BAμE-μLD/LVI-GC-MS(SIM). a: SX; b: C18. Condições do ensaio: 5 mL de água ultrapura fortificada com 100 μL de solução mistura de TCA com concentração de 500,0 μg/L; microextração 3h (750/990/1250 rpm), pH 5,5; retroextração: 90 μL de MeOH:ACN (50:50, v:v), 30 min sob tratamento ultrassônico.

4.3.2.2. Efeito do pH

O pH foi ajustado de forma a obter o soluto parcialmente ou totalmente na sua forma não ionizada, influenciando o equilíbrio da reação, para serem obtidos os máximos valores de eficiência de extração. Esta condição é mais favorável pois sendo os sorventes utilizados do tipo fase-reversa a extração é mais bem-sucedida quando os compostos se encontram ionizados [36,50,76].

No Anexo 4 pode-se observar a especiação dos compostos em função do pH e, que a forma molecular desejada se encontra maioritariamente em valores de pH básicos, sendo que a pH 12 será quando todas as espécies se encontram 100% na forma não ionizada. Como os valores de pKa indicam estes compostos são bases fracas, assim em soluções alcalinas estes estarão neutralizados e a sua solubilidade diminuirá. Foram testados diversos valores de pH (2,0; 5,5; 8,0; e 12,0). O valor mais ácido foi estudado para confirmar que não seria a melhor condição, o pH 8 foi estudado pois é o ponto imediatamente antes do valor de pKa para a maioria dos compostos, e por último estudou-se o valor de pH 12,0, pois pela análise dos gráficos de especiação dos compostos já referidos é o ponto onde estaremos na presença de formas completamente neutras para todos os TCAs. Podemos observar os resultados com a fase sorvente SX e com a fase sorvente C18 nos gráficos da Figura 4.11. É possível concluir que os melhores resultados se verificam a pH 12 tal como esperado quando utilizado o polímero C18. Quando os compostos estão na sua forma neutra promovem interações de fase-reversa com esta fase sorvente. Quanto ao SX de uma forma geral as recuperações médias são constantes para os diferentes valores de pH, resultado explicado devido à ocorrência de interações do tipo dipolo-dipolo e por pontes de hidrogénio para além das interações de fase-reversa. Continuou-se então o estudo apenas com o sorvente C18 e a pH 12,0, pois apresentou recuperações médias, em geral, superiores a SX.

Estas observações vão de acordo com o que é descrito na literatura. Segundo Mofazzeli *et al.* que usou microextração líquido-líquido assistida por ar (AALLME, do inglês *air-agitated or air-assistited liquid-liquid microextraction*), pHs superiores a 10 é o pH ideal para a extração de TCAs, uma vez ser suficientemente básico para neutralizar os mesmos, que inicialmente se encontram em forma de hidrocloreto [33]. Também Mohebbi *et al.* relata que existe uma melhoria da extração quando se aumenta o pH até 10 e que a valores de pH superiores a extração permanece constante, atribuindo também este facto aos analitos serem muito mais facilmente extraídos na sua forma neutra, quando comparando com as formas iónicas, onde existe protonação dos seus grupos aminas, a extração foi efetuada com recurso a DSPE-DES-AALLME e utilizando um polímero octadecil [16]. Unceta *et al.* afirma que para analitos de carácter básico como estes que estamos a estudar, as melhores recuperações acontecem para pH 11, devido à predominância de formas não iónicas nestes valores de pH, contudo neste estudo não foram estudados valores superiores a 11, para a extração foi utilizada SBSE(PDMS) [77].

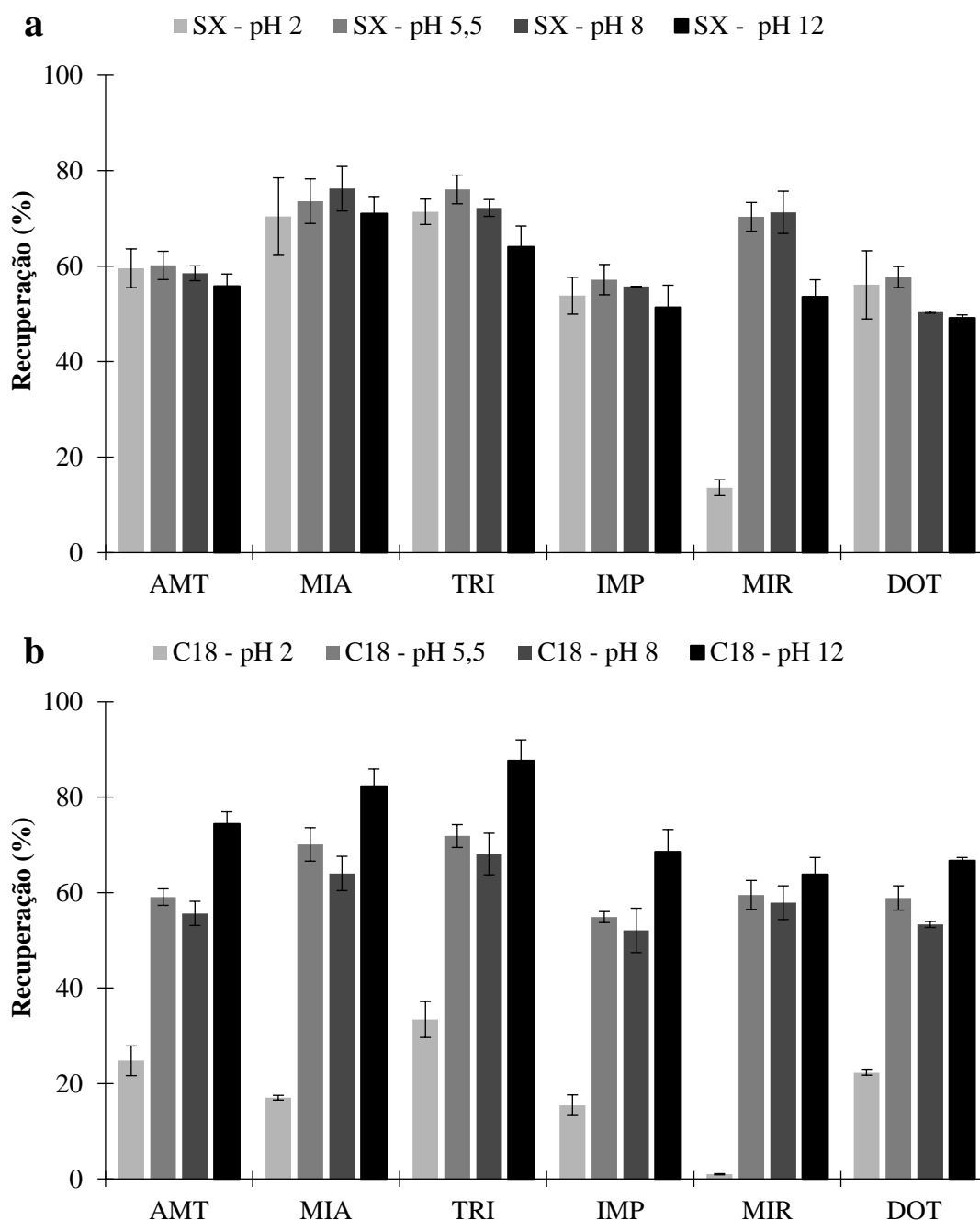


Figura 4.11 - Efeito do pH no enriquecimento dos TCAs em estudo em água ultrapura, obtido por BAμE-μLD/LVI-GC-MS(SIM). a: SX; b: C18. Condições do ensaio: 5 mL de água ultrapura fortificada com 100 μL de solução mistura de TCA com concentração de 500,0 μg/L; microextração 3 h (990 rpm), pH 2,0/5,5/8,0/12,0; retroextração: 90 μL de MeOH:ACN (50:50, v:v), 30 min sob tratamento ultrassônico.

4.3.2.3. Efeito do modificador orgânico

O modificador orgânico utilizado neste estudo foi o MeOH. A sua função é minimizar a possível adsorção de analitos às paredes de vidro do frasco de amostragem, *wall-effect*, contudo também pode aumentar a solubilidade dos solutos na fase aquosa, diminuindo as recuperações obtidas. Geralmente para compostos com $\log K_{OW}$ elevados (> 5) o MeOH minimiza a adsorção dos analitos ao vidro do frasco de extração. Ou seja, em compostos apolares a recuperação tem tendência a aumentar com a

adição de MeOH, tal como mencionado em alguns trabalhos. Este é um parâmetro que deve ser cautelosamente otimizado pois para alguns casos, até 5% de MeOH pode aumentar a eficiência de extração e quantidades mais altas ter o efeito contrário, pois pode aumentar a solubilidade dos compostos de tal ordem que a partição para a fase sorvente pode ser comprometida [36,60].

Podemos observar na Figura 4.12 que os valores mais elevados de recuperação são obtidos quando nenhuma quantidade de MeOH é adicionada, o que seria expectável tendo em conta a informação acima referida e o facto dos $\log K_{O/W}$ dos TCAs em estudo ser menor que 5, tal como evidenciado na

Tabela 4.1. Contudo é possível observar que para percentagens mais altas de MeOH a recuperação começa a aumentar, uma possível causa é o excesso de MeOH impedir a adsorção dos analitos no vidro do frasco de amostragem. Prosseguiu-se o trabalho sem adição de modificador

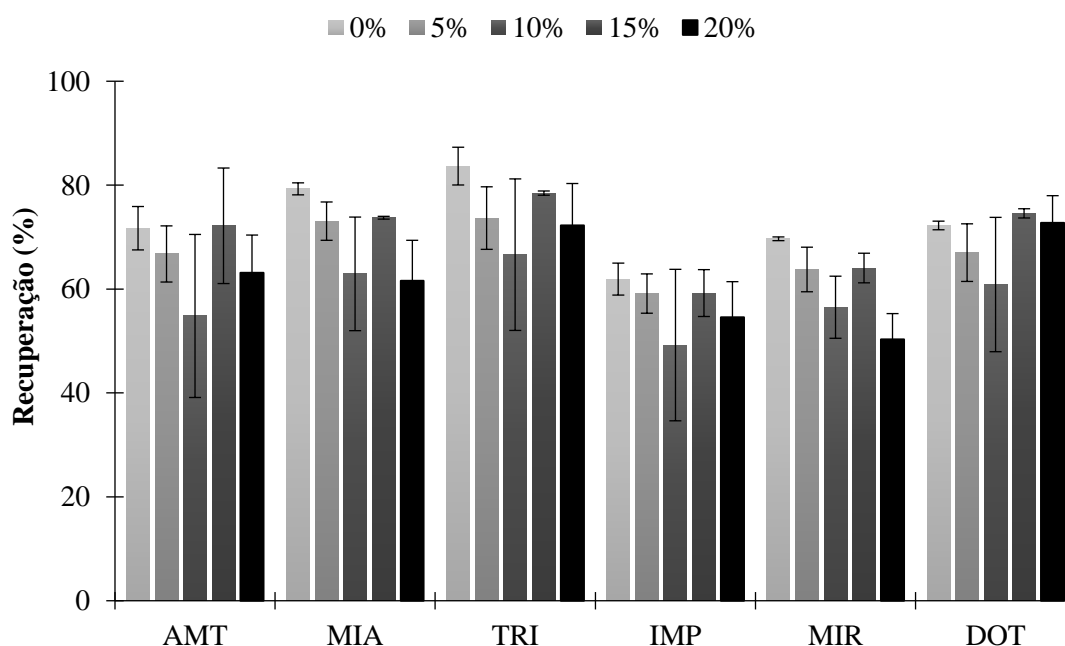


Figura 4.12 - Efeito da seletividade do modificador orgânico no enriquecimento dos TCAs em estudo em água ultrapura, obtido por BA μ E(C18)- μ LD/LVI-GC-MS(SIM). Condições do ensaio: 5 mL de água ultrapura (com 0/5/10/15/20% de MeOH) fortificada com 100 μ L de solução mistura de TCA com concentração de 500,0 μ g/L; microextração 3 h (990 rpm), pH 12,0; retroextração: 90 μ L de MeOH:ACN (50:50, v:v), 30 min sob tratamento ultrassónico.

orgânico.

4.3.2.4. Efeito da força iónica

Outro modificador de matriz vastamente utilizado em técnicas de microextração é o cloreto de sódio (NaCl), com o objetivo de modificar a força iónica da solução. Este sal inerte é utilizado principalmente para causar o efeito de *salting-out*. Em geral, para analitos apolares ou hidrofóbicos ($\log K_{O/W} > 3,5$), a sua adição não melhora a recuperação, podendo mesmo reduzir a eficiência da extração. Esta diminuição na eficiência pode ser justificada por diversas razões, nomeadamente: (1) a adição do sal pode causar um “efeito de óleo”, que promove a movimentação dos compostos apolares para a superfície da amostra aquosa, minimizando o contacto com o dispositivo de microextração (2) causar um aumento da viscosidade, o que abranda a cinética de microextração (3) a área superficial da fase

polimérica fica obstruída com iões do sal, diminuindo a área superficial disponível para interagir com os analitos. Desta forma, para analitos polares a adição de um sal inerte reduz a solubilidade da água e pode aumentar a eficiência da extração. Podendo existir discrepâncias com estas regras gerais, sendo que existem evidências de uma contribuição positiva e negativa para o mesmo composto em estudos diferentes, sendo assim a adição de sal deve ser cuidadosamente estudada para cada caso [36,60]. Observa-se no gráfico da Figura 4.13 o estudo efetuado para a adição de um sal inerte. É possível observar uma melhoria quando adicionado 5 % de NaCl, e que decresce com a adição de maior quantidade. Neste sentido decidiu-se utilizar 5 % de NaCl.

Num estudo realizado por Jafari *et al.*, onde foi utilizado *hollow-fiber* para a microextração, com analitos semelhantes também este parâmetro é avaliado, e é selecionada uma concentração de 5% de NaCl para a extração dos compostos estudados, o que vai de encontro com os resultados obtidos neste trabalho. Este justifica que a 5% é atingido o máximo de extração seguido por um declínio na eficiência da extração com a adição de mais sal. Isto pode acontecer pois inicialmente devido ao efeito *salting-out*, onde diminui a quantidade de água disponível para dissolver as moléculas dos analitos na água, a eficiência aumenta, contudo a concentrações mais altas o efeito *salting-in* pode ocorrer, onde as moléculas do analito podem participar em interações eletrostáticas com os iões do sal em solução, reduzindo assim a transferência de massa [78].

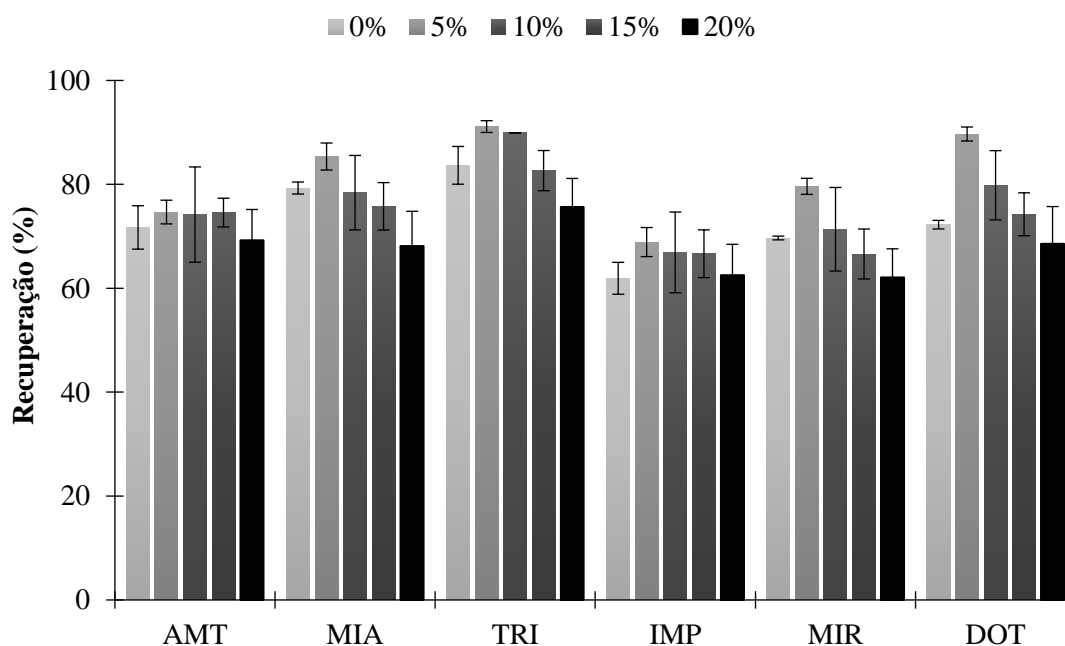


Figura 4.13 - Efeito da força iónica para o enriquecimento dos TCA's em estudo em água ultrapura, obtido por BAμE(C18)-μLD/LVI-GC-MS(SIM). Condições do ensaio: 5 mL de água ultrapura (com 0/5/10/15/20% de NaCl) fortificada com 100 μL de solução mistura de TCA com concentração de 500,0 μg/L; microextração 3 h (990 rpm), pH 12,0; retroextração: 90 μL de MeOH:ACN (50:50, v:v), 30 min sob tratamento ultrassónico.

4.3.2.5. Efeito do tempo de equilíbrio

O tempo de equilíbrio é uma das variáveis mais estudadas. Ao trabalhar em condições de equilíbrio é possível garantir a máxima sensibilidade e melhor precisão. Contudo para minimizar o tempo de análise, a sensibilidade e a precisão podem ser sacrificadas ao realizar-se o trabalho em

condições de não equilíbrio [36]. Optou-se por estudar 1, 2, 3, 5 e 16 horas de tempo de extração, como é visível no gráfico da Figura 4.14. Como expectável os melhores resultados surgem para o maior tempo de extração estudado, sendo que será este o escolhido para prosseguir o trabalho, é de enfatizar que não é necessário nenhum cuidado acrescido quando a operação decorre durante a noite, sendo que não foram estudados tempos mais longos devido à impraticabilidade de o fazer. É de notar que o período de 16 h foi o escolhido por forma a garantir a maior percentagem de recuperação possível para todos os TCAs, contudo é de notar que com apenas 1 h todos os analitos apresentam percentagens de recuperação superiores a 65 %, que são suficientes para a determinação dos níveis de TCAs em caso de triagens toxicológicas de emergência, assim caso fosse este o único objetivo deste trabalho o estudo poderia prosseguir a otimização com apenas 1 h de tempo de equilíbrio.

Num estudo com analitos semelhantes, foram estudados tempos de equilíbrio entre 1 e 16 horas, sendo que é observado a necessidade de 16 horas para atingir eficiências elevadas, apesar de ser necessário um período longo para a fase de microextração, este passo analítico pode ser efetuado durante a noite sem qualquer necessidade especial [59].

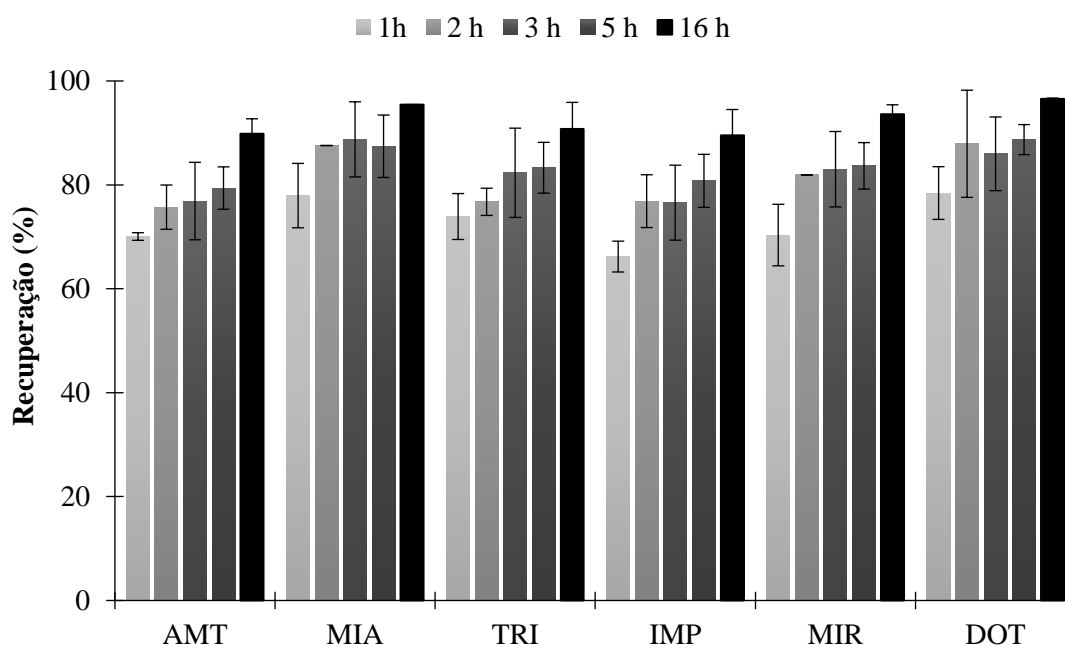


Figura 4.14 - Efeito do tempo de equilíbrio para o enriquecimento dos TCAs em estudo em água ultrapura, obtido por BAμE(C18)-μLD/LVI-GC-MS(SIM). Condições do ensaio: 5 mL de água ultrapura (com 5% de NaCl) fortificada com 100 μL de solução mistura de TCA com concentração de 500,0 μg/L; microextração 1/2/3/5/16 h (990 rpm), pH 12,0; retroextração: 90 μL de MeOH:ACN (50:50, v:v), 30 min sob tratamento ultrassónico.

4.3.2.6. Efeito da diluição da amostra

Foi ainda estudado o efeito da variação da diluição da amostra utilizado, variando a concentração ao fortificar sempre com a mesma quantidade, mas aumentando o volume da amostra. Conforme refere a equação 1.1 previamente referida, observa-se de forma geral para técnicas de microextração que o equilíbrio depende da concentração de cada composto e da razão entre o volume de amostra e o volume da fase sorvente. A recuperação de um analito está dependente da razão entre a constante de partição e a razão entre o volume da amostra e a fase sorvente. Mantendo o volume de fase

sorvente constante, com a diminuição do volume da amostra é expectável que a recuperação aumente. Ou seja, quanto maior o volume de amostra menor a eficiência da extração, mas por outro lado com maior volume, a resposta cromatográfica pode aumentar devido ao aumento da massa do analito. Teoricamente a quantidade extraída aumenta proporcionalmente com o aumento da quantidade de amostra, sendo que utilizando uma amostra maior resulta em maior sensibilidade. Contudo com o aumento do volume da amostra o tempo necessário para atingir o equilíbrio aumenta drasticamente, com o aumento do volume da fase sorvente este diminui. Assim, a razão entre o volume da amostra e o volume da fase sorvente deve ser otimizada tendo como objetivo alcançar um tempo de extração aceitável na prática [36,42–44].

É possível observar no gráfico da Figura 4.15 os resultados obtidos para os diferentes volumes. O volume escolhido foi 5 mL. O volume de 10 mL também demonstrou bons resultados, mas deu-se preferência a 5 mL de forma a gastar menos volume.

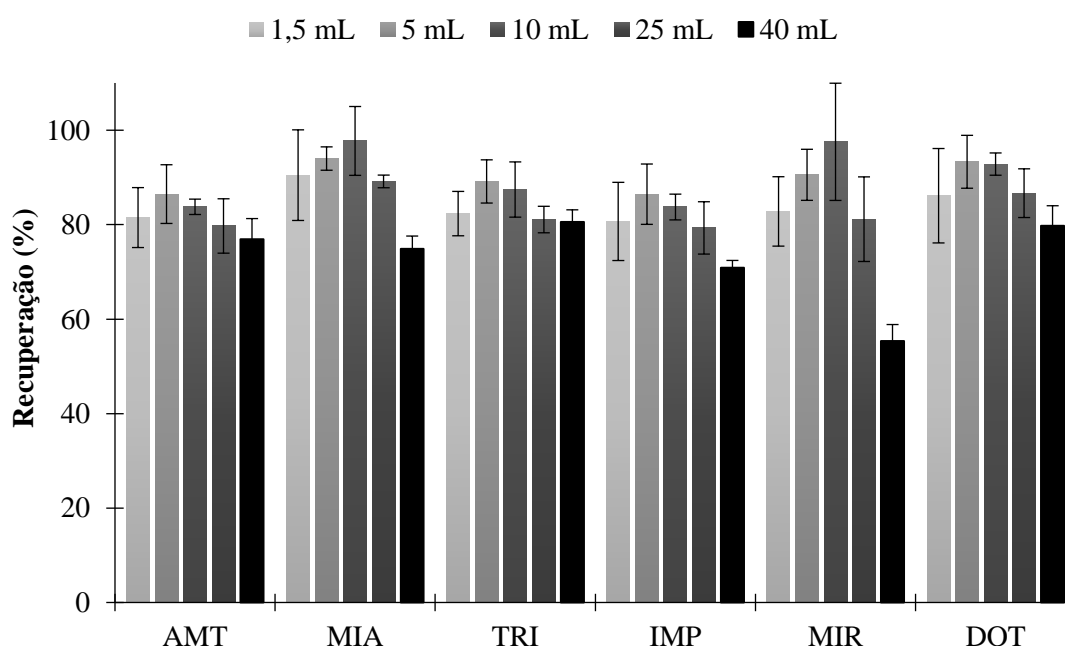


Figura 4.15 - Efeito do volume da amostra no enriquecimento dos TCAs em estudo em água ultrapura, obtido por BAμE(C18)-μLD/LVI-GC-MS(SIM). Condições do ensaio: 1,5/5,0/10,0/25,0/40,0 mL de água ultrapura (com 5% de NaCl) fortificada com 100 μL de solução mistura de TCA com concentração de 500 μg/L; microextração 16 h (990 rpm), pH 12,0; retroextração: 90 μL de MeOH:ACN (50:50, v:v), 30 min sob tratamento ultrassônico.

4.3.2.7. Efeito do tipo de suporte do dispositivo BAμE

Tal como referido anteriormente, a BAμE utiliza um dispositivo de PP em forma de barra (com 3 mm de diâmetro). Este dispositivo é facilmente produzido em laboratório ao revestir as barras de PP com o adesivo conveniente, onde o material sorvente mais conveniente é fixado (< 5 mg). Experimentalmente, o ciclo analítico com BAμE consiste em dois passos, a microextração e a retroextração (este efetuado por LD). O último processo é o passo limitativo, uma vez que é necessária manipulação substancial, podendo chegar aos 6 passos (*e.g.* remover o dispositivo do frasco de amostragem, colocar o dispositivo num *vial* contendo o solvente orgânico conveniente, tratamento ultrassônico, remover o dispositivo do *vial*, entre outros). Desta forma, este processo não é o mais conveniente para o utilizador nem como interface com sistemas instrumentais, principalmente, para

análises de rotina. Após o início do planejamento deste trabalho surgiu um novo ciclo analítico que tentou diminuir ainda mais o número de passos durante a retroextração, tornando o dispositivo mais compatível como interface com sistemas instrumentais, e melhorando o dispositivo para trabalho de rotina. Assim, foi proposto recentemente um novo ciclo analítico com uma nova geração de dispositivos BAμE de menores dimensões e mais flexíveis, para ultrapassar os obstáculos enumerados anteriormente. Este pode ser observado na Figura 4.16. Este novo dispositivo permitiu realizar a retroextração num único passo e possibilitou a compatibilidade com os sistemas com injeção automática. No novo ciclo analítico proposto, após a microextração, o dispositivo analítico é removido do frasco de amostragem, transferido para um *vial* contendo um *insert* e 100 μL do solvente orgânico adequado, após o tratamento ultrassônico, o *vial* contendo o dispositivo pode ser imediatamente submetido a análise instrumental. Os dispositivos BAμE de nova geração são preparados em laboratório utilizando suportes cilíndricos e flexíveis de *nylon* (tendo 7,5 mm de comprimento e 1 mm de diâmetro), revestidos com um filme adesivo onde é fixado o sorvente conveniente (aproximadamente 0,5 mg) [59,79].



Figura 4.16 - Procedimento experimental proposto no novo ciclo BAμE [79].

Até ao momento o mais recente ciclo analítico com BAμE apenas tinha sido aplicado em conjunto com HPLC, neste trabalho será utilizado em conjunto com GC-MS pela primeira vez.

Assim, decidiu-se estudar qual seria o efeito da mudança de tipo de dispositivo de microextração. O passo de retroextração com barras de PP requer manipulação substancial (remover o dispositivo do frasco de extração colocá-lo num *vial* com o solvente orgânico mais conveniente tratamento ultrassônico remover o dispositivo do *vial*), torna-se assim importante estudar dispositivos

que sejam mais convenientes e que aumentem a produtividade, especialmente em análises de rotina. As barras de *nylon* permitem que a retroextração seja realizada dentro de *vials* de vidro comuns, garantindo espaço suficiente para a agulha de injeção do sistema instrumental, aquando da fase de análise, entrar e sair do vial sem qualquer contacto, dado que são mais pequenas e flexíveis. Como é de prever, a quantidade de fase sorvente diminui. As barras de PP (15 mm × 3 mm) contêm menos que 5 mg de fase sorvente, e as barras de *nylon* (7,5 mm × 1 mm) contêm aproximadamente 0,5 mg, sendo assim possível observar a grande diferença de quantidade de fase sorvente. Um artigo anterior com o mesmo objetivo de comparação, e utilizando analitos semelhantes, afirma que as recuperações não são afetadas pela diferença de quantidade de fase sorvente, sendo que isto é possível devido à alta capacidade das mesmas, provando ser efetiva para os níveis vestigiais utilizados [59].

Assim, efetuou-se a mesma comparação neste trabalho, e é possível observar no gráfico da Figura 4.17 o mesmo que referido anteriormente: não há uma variação significativa aquando do uso de ambos os suportes. Sendo assim continuou-se o trabalho com os dispositivos de microextração em suporte de *nylon* devido às suas vantagens já referidas.

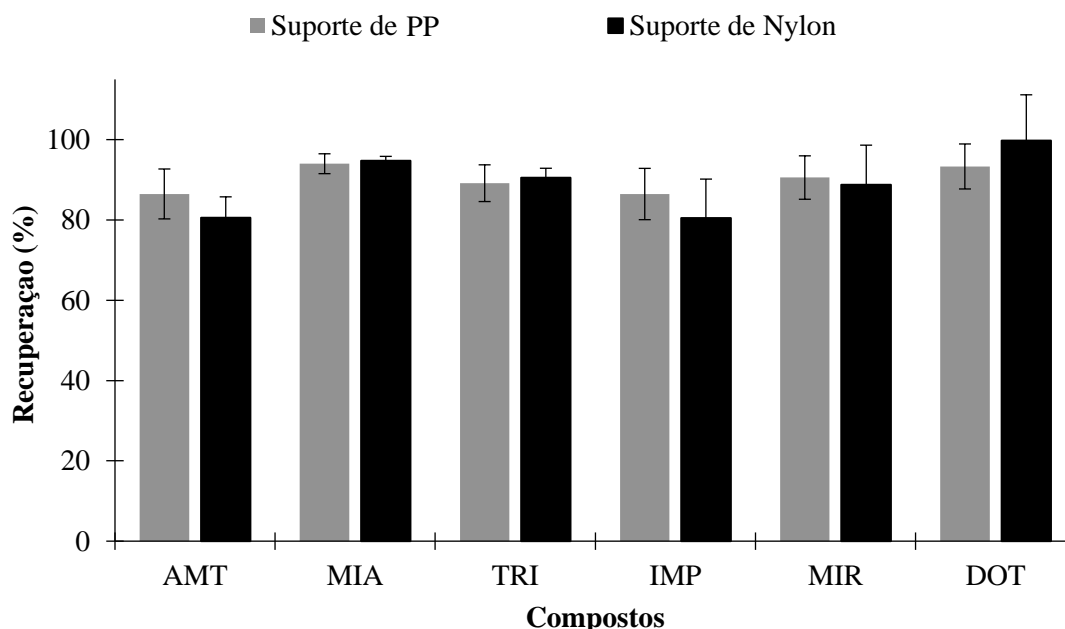


Figura 4.17 - Efeito do tipo de suporte do dispositivo BAμE para o enriquecimento dos TCAs em estudo em água ultrapura, obtido por BAμE(C18)-μLD/LVI-GC-MS(SIM). Condições do ensaio: 5,0 mL de água ultrapura (com 5% de NaCl) fortificada com 100 μL de solução mistura de TCA com concentração de 500 μg/L; microextração 16 h (990 rpm), pH 12,0; retroextração: 90 μL de MeOH:ACN (50:50, v:v), 30 min sob tratamento ultrassônico.

Após estudados os parâmetros anteriores, ainda seria possível testar outros, descritos em trabalhos anteriores, sendo que o mais notório é a temperatura de extração. A temperaturas elevadas o equilíbrio de extração é atingido mais rapidamente, dado que a solubilidade dos analitos em água aumenta com a temperatura, o coeficiente de partição ($K_{O/W}$) dos analitos decresce, diminuindo também a capacidade de extração, observando-se uma melhoria com aumento da temperatura até 40-60 °C, contudo este não é normalmente avaliado e as extrações são maioritariamente realizadas à temperatura ambiente, sendo que o estudo sem aumento da temperatura possibilita a obtenção de maior sensibilidade [36,60].

4.4. Condições experimentais otimizadas

Na Tabela 4.3 encontram-se as condições otimizadas para o método desenvolvido para o estudo dos seis TCAs.

Tabela 4.3 - Condições otimizadas para o método desenvolvido.

Condições experimentais otimizadas	
Sorvente	C18
Tempo de equilíbrio (h)	16
Velocidade de agitação (rpm)	990
pH da matriz	12,0
MeOH (%)	0
NaCl (%)	5
Tempo de retroextração (min)	30
Solvente de retroextração	MeOH:ACN (50:50, v:v)
Volume de amostra (mL)	5

A otimização destes parâmetros permitiu obter recuperações médias em água ultrapura compreendidas entre 80,5 e 99,6 % para os seis analitos em estudo, apresentadas na Tabela 4.4.

Tabela 4.4 - Recuperações médias dos analitos nas condições otimizadas do método desenvolvido.

TCAs	Recuperação (%) \pm RSD (%) (<i>n</i>=6)
AMT	80,5 \pm 6,5
MIA	94,7 \pm 1,2
TRI	90,5 \pm 2,6
IMP	80,4 \pm 12,1
MIR	88,7 \pm 11,1
DOT	99,6 \pm 11,4

4.5. Validação do método

4.5.1. Calibração em amostras de urina

O presente trabalho tem como objetivo a aplicação do método a matrizes reais, nomeadamente amostras de urina. Desta forma, torna-se imprescindível a validação da metodologia. Tal como referido antes de se utilizarem as amostras de urina estas foram hidrolizadas. A hidrólise foi efetuada para eliminar a maioria dos compostos interferentes, tais como a carbamida, ácido úrico, sais de cálcio glicose, e fosfato de cálcio. Este processo foi efetuado tal como indicado em estudos anteriores, com apenas algumas adaptações [19].

4.5.1.1. Limiares analíticos e gama dinâmica de trabalho/linearidade

A sensibilidade da metodologia proposta foi determinada pelo LOD, sendo avaliada pela razão sinal/ruído (S/N) de 3:1. Neste sentido começou por se fortificar amostras de forma a obter 11 níveis de concentração entre 0,1 e 100,0 µg/L, para observar a linearidade que existia entre estas concentrações. Com este estudo foi possível concluir quais os limites de deteção para cada TCA em urina, estes resultados estão presentes na Tabela 4.5.

Tabela 4.5 - Resultados obtidos para o LOD aquando da validação no método em urina.

TCAs	LOD (µg/L)
AMT	0,20
MIA	0,20
TRI	0,20
IMP	0,20
MIR	0,39
DOT	1,56

Contudo, os resultados obtidos para o intervalo de concentrações acima escolhido não eram bem-sucedidos nos testes em seguida efetuados, nomeadamente na dispersão de resíduos e posteriormente na exatidão. Assim foi necessário eliminar a maioria dos pontos de concentração mais baixa para haver algum sentido nos resultados. Assim decidiu-se estudar uma nova gama de linearidade com 9 níveis de concentração entre 10,0 e 1000,0 µg/L, sendo que está acordo com estudos previamente elaborados com a mesma matriz e com os mesmos compostos [18,21,33,80].

Procedeu-se então à construção das retas de calibração para a gama linear referida. Iniciou-se por testar uma regressão linear simples. Observando as retas obtidas foi possível verificar boa linearidade ($r^2 \geq 0,9914$). Também segundo o teste F (também conhecido como *lack-of-fit*), as retas eram adequadas ao trabalho a ser efetuado. Contudo, ao estudar a dispersão de resíduos observou-se que as retas não seriam as mais indicadas para os TCAs em estudo. Este problema era visível pois o valor dos residuais relativos era muito superior ao esperado, notando-se também uma tendência no desenho de residuais. Quando existe uma tendência no valor dos residuais, significa que os valores têm um perfil heterogéneo, sendo isto uma demonstração de heteroscedasticidade, quando se observa uma distribuição em forma de U pode-se estar perante uma falha no ajuste ou falta de linearidade dos dados. Assim surgiu a necessidade de tratar os dados de forma diferente. Sendo que eliminar pontos na reta de calibração não era uma hipótese por ser necessário um mínimo de 5 pontos na reta. Estes problemas podem dever-se à vasta gama de concentrações considerada, mas esta foi escolhida para incluir os níveis terapêuticos, tóxicos e letais das drogas estudadas [27,81,82].

O modelo da regressão linear não ponderado tem sido tradicionalmente utilizado para a calibração, mas não é necessariamente o modelo ideal para todos os casos. Uma das suposições mais comuns quando se fazem regressões lineares ou não lineares, é que cada ponto fornece informação igualmente precisa, contudo isto nem sempre acontece. Assim em casos onde não se pode assumir a homocedasticidade tem de se utilizar uma regressão linear ponderada. Na presença de uma gama muito larga de concentrações, ou seja, quando se utilizam mais de uma ordem de magnitude, os dados não são usualmente homogéneos e assim é normal utilizarem-se modelos de regressão linear ponderadas. A negligência da heteroscedasticidade pode levar a uma perda significativa da precisão, especialmente nas concentrações mais baixas da curva, sendo assim necessário contrariar a maior influência das maiores

concentrações. A regressão errada pode também contribuir para erros sistemáticos de medida. Sendo que um dos erros mais comuns em química analítica é depender apenas do coeficiente de correlação para testar a linearidade, sendo este é um mau indicador de linearidade. Assim e tal como foi efetuado anteriormente neste trabalho, torna-se necessário testar a homocedasticidade dos dados, o que pode ser efetuado utilizando o teste *F* (também conhecido como *lack-of-fit*) e a dispersão de resíduos [27,81,83–85].

No teste *F* os dados podem considerar-se uniformemente distribuídos quando o valor tabelado de *F* é maior que o valor calculado de *F*, sendo que o primeiro é obtido de uma tabela de valores de distribuição de *F* dependente do nível de confiança e dos graus de liberdade, neste trabalho utilizou-se 95% como nível de confiança. A dispersão de resíduos demonstra a diferença entre os valores medidos e aqueles calculados pela equação da regressão, resultando em gráficos de resíduos vs. concentração. Quando os resultados não passam nestes testes, a heteroscedasticidade dos dados é confirmada, e é necessário escolher um modelo de calibração mais apropriado [82,83]. Na Tabela 4.6, apresentam-se os valores do teste *F*. É possível observar que o valor do *F* tabelado é sempre maior.

Tabela 4.6 - Valores do *F* tabelado e do *F* calculado para os diversos compostos em análise.

TCAs	<i>F</i> tabelado	<i>F</i> calculado
AMT	2,74	0,017
MIA	2,58	0,034
TRI	2,58	0,002
IMP	2,74	0,010
MIR	2,58	0,024
DOT	2,58	0,004

Tal como referido anteriormente os modelos ponderados são normalmente adotados para minimizar a grande influência que as concentrações mais altas têm sobre a regressão. Um modelo ponderado ideal irá equilibrar a regressão de forma a criar um erro que é uniformemente distribuído pela gama de calibração. Os fatores de ponderação apropriados, w_i podem ser calculados a partir do inverso da variância, s_i^{-2} , tal como indicado na equação 4.1 [81–83,86].

$$w_i = \frac{s_i^{-2}}{\sum_i \frac{s_i^{-2}}{n}} \quad 4.1$$

Contudo, este método não é prático, dado que requer variadas determinações para cada ponto de calibração e requer uma nova reta de calibração cada vez que o método é utilizado. Assim utilizam-se fatores de ponderação empíricos baseados na variável *x* (concentração) e na variável *y* (sinal obtido), estes fornecem uma aproximação simples. Os mais utilizados são $1/y^{1/2}$, $1/y$, $1/y^2$, $1/x^{1/2}$, $1/x$, $1/x^2$, estes devem ser todos testados e deve-se escolher o que tenha menor percentagem relativa de erro. Neste trabalho escolheu-se trabalhar com o fator de ponderação $1/y$ [20,27,83,87].

Para realizar uma regressão linear ponderada é necessário calcular diversos parâmetros como a percentagem relativa do erro (aquando da decisão do fator de ponderação), o “a” e “b” de uma equação do tipo $y=ax+b$ e por último o coeficiente de correlação. Estes cálculos encontram-se explicados no Anexo 5.

Existem relatos anteriores do uso deste tipo de retas de calibração em artigos de propósitos forenses, com utilização de GC-MS para triagem e quantificação, com utilização de técnicas de extração com sorventes como SPE, microextração em sorvente empacotado (MEPS, do inglês *microextraction by packed sorbent*), e com antidepressivos como os estudados neste trabalho. O modelo de regressão linear ponderada está a tornar-se cada vez mais comum apesar da sua complexidade adicional [20,27,29,81,84,87–89].

Após o estudo do gama de linearidade foi possível obter os valores para o limite de quantificação inferior (LLOQ, do inglês *Lower Limit of Quantification*). O LLOQ é a concentração mais baixa a que é possível quantificar de acordo com os parâmetros de precisão e de exatidão, ou seja, a concentração onde o RSD é $< 20\%$ (para os restantes pontos aceitam-se valores de RSD até 15%), este é também utilizado como o primeiro ponto da reta. O LLOQ é de $10,0\text{ }\mu\text{g/L}$ para todos os analitos em estudo.

A linearidade, tal como referido, foi avaliada com recurso a regressões lineares ponderadas. Todos os parâmetros necessários foram obtidos com recurso às equações acima referidas, e estão descritos na Tabela 4.7. As curvas de calibração ponderadas, obtidas pelo método de adição padrão, podem ser observadas no Anexo 6.

Tabela 4.7 - Parâmetros de regressão relativos à gama dinâmica de trabalho para a presente metodologia.

TCAs	Gama linear ($\mu\text{g/L}$)	a	b	r^2
AMT	10,0-1000,0	34,4780	-0,0174	0,9974
MIA		7,3701	-0,0026	0,9974
TRI		13,0250	-0,0033	0,9988
IMP		3,5398	-0,0027	0,9960
MIR		11,2264	-0,0026	0,9982
DOT		29,1992	-0,0094	0,9978

4.5.1.2. Exatidão e precisão

Tal como referido na parte experimental a determinação da exatidão e precisão foi efetuada intra ($n=6$) e inter-dias ($n=18$), a concentrações de 10,0; 50,0; 500,0 e 1000,0 $\mu\text{g/L}$. O critério de aceitação para a exatidão e precisão foi que os valores residuais relativos e os RSDs deveriam ser $\leq 15\%$, exceto para os valores de LLOQ onde foram aceites valores $\leq 20\%$, tal como reportado na literatura [55,68]. Os resultados podem ser observados na Tabela 4.8.

Tabela 4.8 - Valores de exatidão e precisão para os vários níveis de fortificação escolhidos (LLOQ-10,0 µg/L Baixo-50,0 µg/L Médio-500 µg/L Alto-1000 µg/L), tanto para o estudo intra-dia como para os estudos inter-dias.

TCAs	Nível de fortificação (µg/L)	Intra-dia			Inter-dia		
		Exatidão (%) ± Precisão (%)			Exatidão (%) ± Precisão (%)		
AMT	10,0	5,09	±	8,22	20,38	±	15,46
	50,0	-5,45	±	4,59	-5,02	±	8,85
	500,0	1,65	±	4,75	2,90	±	12,18
	1000,0	4,78	±	8,74	-4,38	±	11,82
MIA	10,0	-6,59	±	4,26	-2,79	±	16,67
	50,0	-0,54	±	11,13	0,13	±	13,22
	500,0	4,75	±	8,60	1,89	±	11,80
	1000,0	-0,13	±	8,92	2,49	±	13,17
TRI	10,0	0,93	±	6,76	13,14	±	18,12
	50,0	-1,71	±	6,08	10,97	±	13,81
	500,0	5,66	±	4,84	13,04	±	9,21
	1000,0	-4,07	±	13,27	5,82	±	11,72
IMP	10,0	-8,43	±	9,60	14,78	±	17,56
	50,0	6,68	±	12,76	2,42	±	14,35
	500,0	-1,21	±	6,28	14,18	±	14,94
	1000,0	-0,54	±	11,16	-4,31	±	10,05
MIR	10,0	1,31	±	15,07	15,91	±	19,89
	50,0	13,31	±	0,91	14,49	±	2,08
	500,0	6,45	±	5,99	12,95	±	12,06
	1000,0	-0,16	±	7,31	11,09	±	13,84
DOT	10,0	8,11	±	0,42	14,12	±	9,39
	50,0	14,18	±	2,47	1,00	±	13,54
	500,0	-8,21	±	10,29	-4,53	±	14,48
	1000,0	-12,03	±	7,23	-8,19	±	10,14

4.5.1.3. Efeitos de matriz, recuperações médias e eficiência do processo

Os ensaios para os efeitos de matriz, recuperações médias e eficiência do processo foram efetuados como referido na parte experimental. Foram preparados seis conjuntos de amostras cada um a duas concentrações diferentes, foram utilizadas as concentrações, 25,0 e 750,0 µg/L. Os resultados estão expressos na Tabela 4.9. Efeitos de matriz acima dos 100 % indicam enriquecimento iónico, enquanto que valores abaixo dos 100 % indicam supressão iónica [29,68], os resultados obtidos evidenciam que o efeito de matriz não é significativo neste trabalho, contudo é difícil eliminá-lo completamente [90]. Os valores das recuperações médias e da eficiência do processo estão muito próximos de 100 % o que é o ideal.

Tabela 4.9 - Efeito de matriz, recuperações médias e eficiência do processo para os níveis de fortificação escolhidos.

TCAs	Nível de fortificação (µg/L)	Efeitos de Matriz (%)			Recuperações Médias (%)			Eficiência do Processo (%)		
AMT	25,0	90,21	±	6,63	95,30	±	9,59	85,97	±	7,54
	750,0	93,73	±	12,46	107,90	±	6,86	101,13	±	12,89
MIA	25,0	100,06	±	9,80	95,33	±	7,21	95,39	±	8,63
	750,0	111,52	±	11,23	111,49	±	7,72	124,34	±	11,72
TRI	25,0	102,09	±	8,40	103,31	±	9,29	105,47	±	11,95
	750,0	99,25	±	8,22	109,02	±	5,03	108,20	±	7,91
IMP	25,0	91,94	±	4,07	92,31	±	11,06	84,87	±	10,43
	750,0	109,34	±	13,89	106,50	±	9,97	116,45	±	12,62
MIR	25,0	95,56	±	10,91	108,46	±	12,26	103,64	±	12,03
	750,0	112,85	±	14,40	98,95	±	9,89	111,66	±	13,89
DOT	25,0	91,28	±	4,36	99,63	±	8,98	90,95	±	8,43
	750,0	99,40	±	11,59	103,68	±	7,54	103,06	±	13,90

4.6. Aplicação a amostras reais

Tal como referido na parte experimental foram analisadas amostras cedidas pelo grupo Joaquim Chaves Saúde. Foram analisadas 52 amostras pelo método proposto otimizado. Começou por se analisar todas as amostras em modo SIM de forma a poder observar se algum composto surge nos tempos de retenção esperados de acordo com os ensaios anteriores. Caso houvesse qualquer composto que se assemelhe àqueles observados para os analitos em estudo, segue-se uma nova análise em modo *full scan* para que tenhamos certeza de que a identificação foi correta.

Tabela 4.10 - Resultado da análise em modo SIM com o método proposto das amostras anónimas.

Amostras cedidas pelo grupo Joaquim Chaves Saúde	Quantidade
Amostras sem a possibilidade de terem compostos alvo	51
Amostras com a possibilidade de terem compostos alvo	1

Tal como mencionado na Tabela 4.10 das análises efetuadas foi encontrado uma amostra desconhecida com possível presença de um dos antidepressivos em estudo, na Figura 4.18 pode observar-se o cromatograma obtido por LVI-GC-MS(SIM). Pelo tempo de retenção a que o pico ocorre verifica-se que podemos estar na presença de uma amostra de uma pessoa que tomou amitriptilina, estando o composto indicado no cromatograma referido.

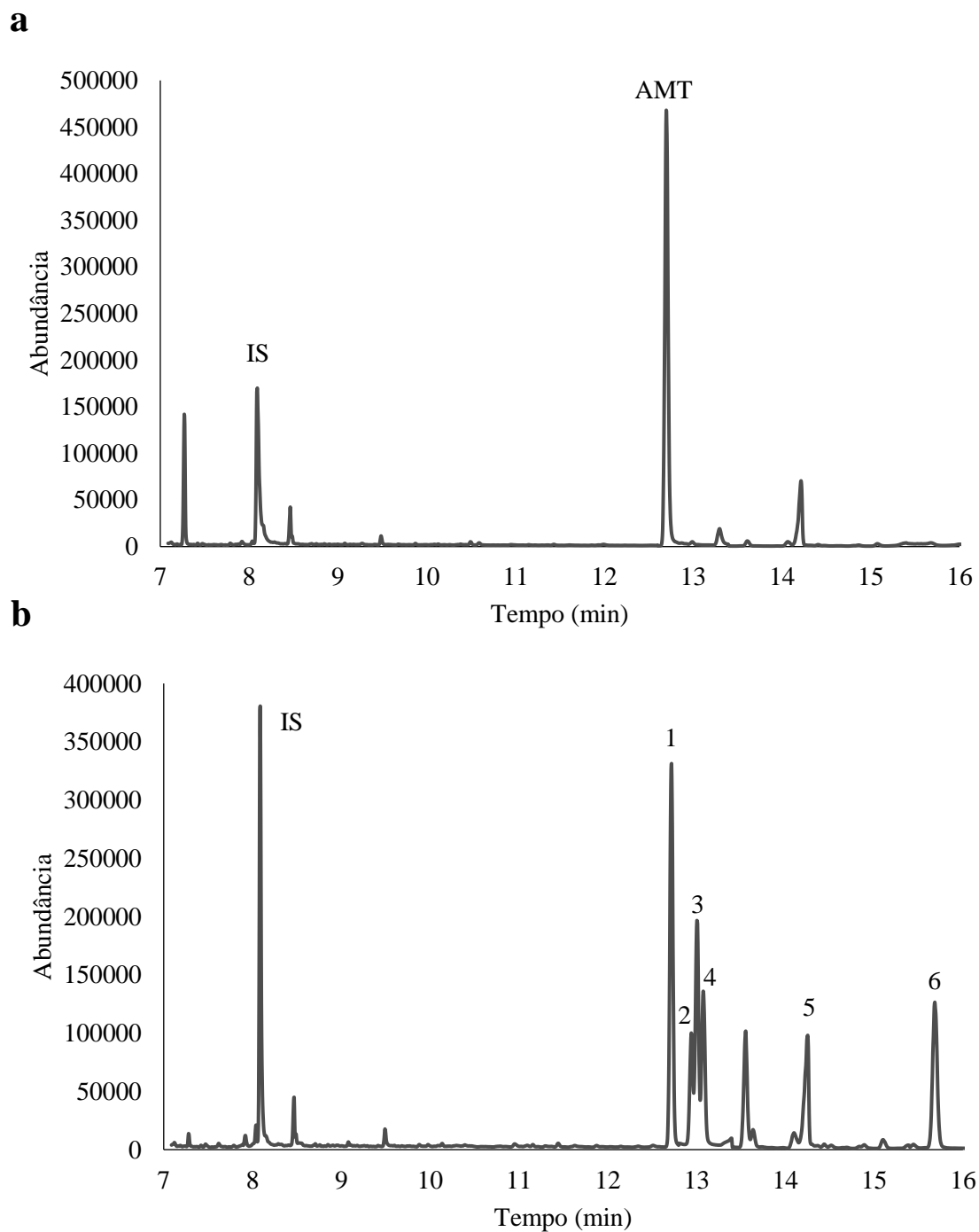


Figura 4.18 – a: Cromatograma obtido da análise de uma amostra desconhecida realizado de acordo com o método otimizado BA μ E(C18)- μ LD/LVI-GC-MS(SIM); b: Cromatograma obtido da análise de uma amostra de urina fortificada (0,1 μ g/L), realizado de acordo com o método otimizado BA μ E(C18)- μ LD/LVI-GC-MS(SIM). (1-AMT 2-MIA 3-TRI 4-IMP 5-MIR 6-DOT).

Seguiu-se a análise da amostra em modo *full scan*, tendo-se observado o espectro de massa correspondente (Figura 4.19). É possível observar grande similaridade entre o espectro anterior e o presente na Figura 4.20 (o espectro de massa obtido característico da AMT), verificando-se também pelo *software* do GC-MS uma grande semelhança com o espectro de massa da biblioteca correspondente ao AMT (94 %).

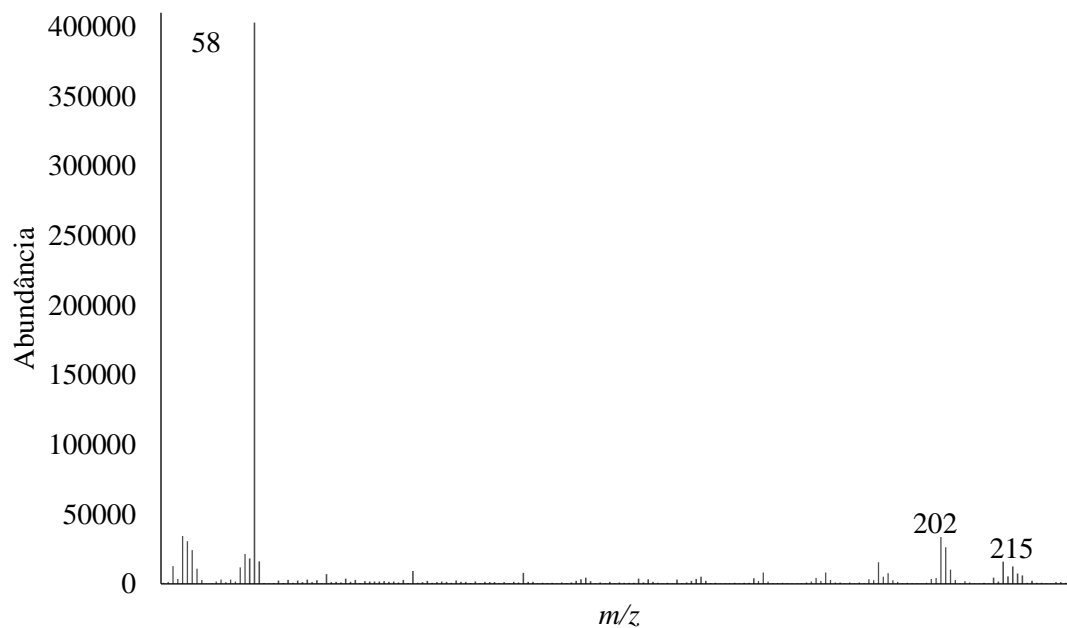


Figura 4.19 - Espetro de massa obtido da amostra desconhecida para confirmação da presença de AMT.

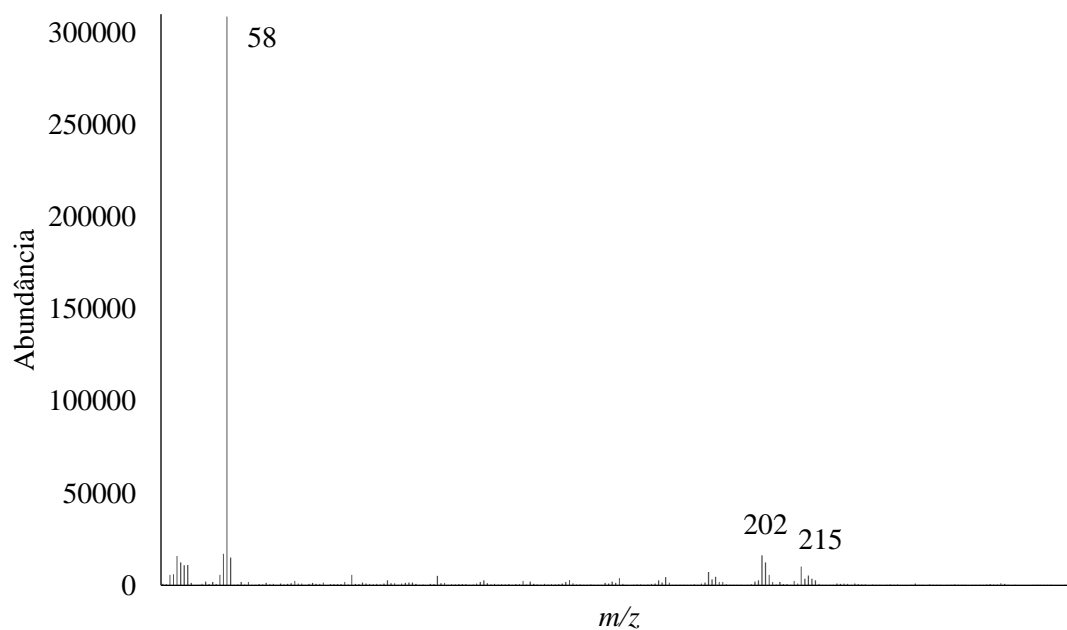


Figura 4.20 - Espetro de massa característico obtido para a amitriptilina após a análise do padrão.

É possível concluir que a amostra desconhecida terá realmente presença de amitriptilina. É então necessário recorrer à equação da regressão linear ponderada de forma a poder quantificar o antidepressivo, sendo também necessário calcular a incerteza deste resultado (os cálculos encontram-se explicados no Anexo 7).

Assim o resultado obtido para amostra desconhecida é de $158,87 \pm 1,93 \mu\text{g/L}$ (Intervalo de Confiança (I.C) 95%), estando este valor está acima da concentração terapêutica, de acordo com os dados recolhidos na Tabela 1.3, onde é possível observar que as concentrações terapêuticas para a amitriptilina são de $35 \pm 2 \mu\text{g/L}$.

4.7. Comparação com estudos anteriores

Em qualquer estudo analítico torna-se importante relacionar o trabalho efetuado com estudos previamente publicados. Esta comparação encontra-se na Tabela 4.11. A amitriptilina e a imipramina são dos analitos mais estudados, existindo vários artigos sobre os mesmos, enquanto que existem poucos estudos sobre a mirtizapina e a dosulepina, sendo estes mais difíceis de encontrar na literatura, sendo assim uma mais valia deste método o estudo de TCAs até agora menos estudados. De uma forma geral, a recuperação tanto em água como em urina obtidos no presente trabalho é superior ou equivalente à encontrada em estudos equivalentes. Quando comparando o RSD é possível observar que este trabalho obteve valores equivalentes, por vezes inferiores que os demais. Os limites de deteção e de quantificação obtidos encontram-se na mesma ordem de grandeza do que aqueles encontrados na literatura. Por fim a gama linear deste trabalho engloba, por motivos acima descritos diversas ordens de grandeza, o que acontece em poucos dos artigos consultados, demonstrando esta uma mais valia do método proposto. Os coeficientes de correlação são em todos os estudos muito próximos de 1.

Como mais valias do método proposto destacam-se as elevadas recuperações e a larga gama linear, sendo assim possível considerar este método uma alternativa real à determinação de TCAs em urina.

Tabela 4.11 - Comparação da recuperação, RSD, LOD, LOQ, gama linear e r^2 de diversos estudos com o trabalho presente.

TCAs	Método analítico	Recuperação (%)		RSD (%)		LOD (ug/L)		LOQ (ug/L)		Gama linear (ug/L)		r^2		Ref.
		água	urina	água	urina	água	urina	água	urina	água	urina	água	urina	
AMT	BA μ E- μ LD/LVI-GC-MS (SIM)	80,5	< 107,9	6,5	< 9,6	0,5	0,20	1,7	10,0 (LLOQ)	2,4 – 2500,0	10,0 – 1000,0	0,9986	0,9974	Presente estudo
	HF-LPME	68,0	-	< 12,0	6,8	0,5	-	1,7	-	5,0 - 500,0	-	0,9978	-	[28]
	MSPE-HPLC/UV	66,7 (RR)	< 99,5 (RR)	-	-	2,0	-	5,0	-	5,0 – 800,0	-	0,9946	-	[17]
	SPE-GC-MS	-	< 64,4	-	< 6,0	-	2,5	-	-	-	7,5 – 300,0	-	0,9963	[20]
	ADLLM-GC	55,0	-	< 5,4	-	1,0	-	10,0	-	10,0 – 3000,0	-	0,9983	-	[33]
	SI-HLLE - DSPE-DLLME-SFO-HPLC-UV	-	84,0	-	< 3,0	-	0,2	-	0,7 (0,4 LLOQ)	-	0,7 – 1000,0	-	0,9970	[21]
	DLLME-GC-MS	-	< 88,2	-	< 7,9	-	0,5	-	2,0	-	2,0 – 100,0	-	0,9990	[25]
	DLLME-HPLC-UV	-	< 102,0	< 4,5	-	68,0	-	205,0	-	20,0 – 3000,0	-	0,9998	-	[26]
MIA	BA μ E- μ LD/LVI-GC-MS (SIM)	94,7	< 111,5	1,2	< 7,7	0,5	0,2	1,7	10,0 (LLOQ)	2,4 – 2500,0	10,0 – 1000,0	0,9983	0,9974	Presente estudo
	SPE-GC-MS	-	< 99,8	-	< 6,8	-	1,0	-	-	-	1,0 - 160,0	-	0,9994	[20]

	GC-SID	-	< 120	-	-	-	1,0	-	-	-	1,3 - 50,0	-	0,9960	[91]
TRI	BA μ E- μ LD/LVI- GC-MS (SIM)	90,5	< 109,0	2,6	< 9,3	0,5	0,2	1,7	10,0 (LLOQ)	2,4 - 2500,0	10,0 - 1000,0	0,9997	0,9988	Presente estudo
	DLLME- HPLC-UV	-	112,0	-	6,1	-	0,6	-	-	-	2,0 - 100,0	-	0,9946	[19]
	SPE – GC- MS	-	< 99,2	-	< 19,0	-	2,0	-	-	-	2,0 - 320,0	-	0,9996	[20]
IMP	BA μ E- μ LD/LVI- GC-MS (SIM)	80,4	< 106,5	12,1	< 11,1	0,5	0,2	1,7	10,0 (LLOQ)	2,4 - 2500,0	10,0 - 1000,0	0,9958	0,9960	Presente estudo
	DLLME- HPLC-UV	-	97,0	-	5,1	-	0,6	-	-	-	2,0 - 100,0	-	0,9951	[19]
	HF-LPME	68,0	-	< 12	6,8	0,5	-	1,7	-	5,0 - 500,0	-	0,9998	-	[28]
	MSPE- HPLC-UV	64,0 (RR)	< 98,5 (RR)	< 4,6	-	2,0	-	5,0	-	5,0 - 800,0	-	0,9977	-	[17]
	EME-GC	90,0	81,0	8,0	9,5	0,4	0,4	-	-	2,0 - 1500,0	2,0 - 1500,0	0,9980	0,9910	[34]
	SI-HLLE- DSPE- DLLME- SFO-HPLC- UV	-	69,0	-	4,0	-	0,3	-	1,1 (0,6 LLOQ)	-	1,1 - 1000,0	-	0,9960	[21]
	DLLME- GC-MS	-	< 103,6	-	< 7,4	-	0,5	-	2,0	-	2,0 - 100,0	-	0,9990	[25]
MIR	BA μ E- μ LD/LVI- GC-MS (SIM)	88,7	< 108,5	11,1	< 12,3	0,5	0,4	1,7	10,0 (LLOQ)	2,4 - 2500,0	10,0 - 1000,0	0,9992	0,9982	Presente estudo

	SPE-GC-MS	-	< 85,8	-	< 20,6	-	1,0	-	-	-	1,0 - 160,0	-	0,9989	[20]
DOT	BA μ E- μ LD/LVI-GC-MS (SIM)	99,6	< 103,7	11,4	< 9,0	0,5	1,6	1,7	10,0 (LLOQ)	2,4 - 2500,0	10,0 - 1000,0	0,9986	0,9978	Presente estudo
	SPE-GC-MS	-	< 80,0	-	< 11,5	-	2,5	-	-	-	7,5 - 320,0	-	0,9989	[20]

ADLLM-GC: Microextração líquido-líquido dispersa pelo ar (do inglês *air-dispersed liquid-liquid microextraction*)

DLLME-GC-MS: Microextração líquido-líquido dispersiva com GC-MS (do inglês *dispersive liquid-liquid microextraction-GC-MS*)

DLLME-HPLC-UV: Microextração líquido-líquido dispersiva com HPLC-UV (do inglês *dispersive liquid-liquid microextraction-HPLC-UV*)

EME-GC - Microextração em eletromembranas acoplado a GC (do inglês *electromembrane microextraction-GC*)

GC-SID: GC com detecção por ionização de superfície (do inglês *gas chromatography with surface ionization detection*)

HF-LPME: Microextração de fase líquida com fibra oca (do inglês *hollow-fiber liquid-phase microextraction*)

MSPE-HPLC-UV: Microextração em fase sólida magnética acoplada com HPLC/UV (do inglês *magnetic solid phase microextraction - HPLC/UV*)

RR: Recuperações Relativas

SI-HLLE-DSPE-DLLME-SFO-HPLC-UV: Extração líquido-líquido homogênea induzida por sal acoplada a extração de fase sólida dispersiva acoplada a microextração líquido-líquido dispersiva baseada na solidificação de uma gota orgânica flutuante acoplada a HPLC-UV (do inglês *salt induced homogeneous liquid-liquid extraction coupled with dispersive solid phase extraction couple with solidification of floating organic drop-HPLC-UV*)

SPE-GC-MS: Extração em fase sólida com GC-MS (do inglês *solid phase extraction - GC-MS*)

5. Conclusão e Perspetivas Futuras

O presente trabalho propõe uma nova metodologia, BA μ E- μ LD/LVI-GC-MS(SIM), para a determinação de seis antidepressivos tricíclicos, a amitriptilina, a mianserina, a trimipramina, a imipramina, a mirtazapina e a dosulepina. A abordagem desenvolvida pode ser utilizada em amostras de urina reais e poderá ser empregue como ferramenta para análise de rotina em contexto clínico, forense e de controlo antidoping. Demonstrou igualmente ser simples, adequada à análise vestigial e amiga do ambiente devido à quantidade reduzida de solvente orgânico. E demonstrou que o mais recente ciclo analítico envolvendo BA μ E é bem-sucedido quando combinado com GC-MS.

Inicialmente verificou-se que o sistema analítico apropriado para todos os analitos seria o GC-MS. A otimização dos parâmetros instrumentais permitiu a análise dos seis TCAs em tempo analítico inferior a 23 min.

Para a preparação das amostras desenvolveu-se uma metodologia à qual é possível aplicar diferentes tipos de materiais sorventes, tendo a fase reversa Supelclean ENVI-18 (C18) sido a que apresentou maior seletividade.

Posteriormente estudou-se a otimização da metodologia desenvolvida, que consistiu no estudo de diversos parâmetros que podem afetar quer a microextração quer a retroextração dos compostos em estudo. As condições otimizadas para extrair os analitos foram 16 h de tempo de equilíbrio (990 rpm), pH a 12, 5 % de NaCl, e 30 min de retroextração utilizando como solvente MeOH:ACN (50:50, v:v), sob tratamento ultrassónico. A otimização permitiu alcançar recuperações médias compreendidas entre 80,5 % e 99,6 %. Sendo importante notar que para a determinação dos níveis de TCAs em caso de triagens toxicológicas de emergência poderia ser utilizado apenas 1 h de tempo de equilíbrio, dado que já é possível obter percentagens de recuperação adequadas (> 65 %).

Procedeu-se de seguida à validação em amostras biológicas, com recurso ao método de adição padrão, neste caso, a matriz utilizada foi urina. Foram determinados LODs compreendidos entre 0,2 e 1,6 μ g/L e LOQs de 10 μ g/L. Verificou-se uma distribuição heterocedástica dos resíduos, pelo que foi realizada uma regressão linear ponderada para cada um dos analitos, trabalhou-se com um fator de ponderação de 1/y. A gama de trabalho selecionada foi entre 10 e 1000 μ g/L, tendo demonstrado boa linearidade ($r^2 > 0,9960$). Posteriormente estudou-se o efeito de matriz, a recuperação média e ainda a eficiência do processo, a dois níveis de fortificação. O efeito de matriz variou entre 90,2 % e 112,9 % (RSD < 13,9 %), a recuperação média variou entre 92,3 % e 111,5 % (RSD < 12,26 %), e a eficiência do processo variou entre 84,9 % e 124,3 % (RSD < 13,9 %).

O método desenvolvido BA μ E- μ LD/LVI-GC-MS (SIM) foi posteriormente aplicado a 52 amostras de dadores anónimos fornecidas por uma clínica de análises. Nestas foi possível encontrar uma amostra positiva para a presença de amitriptilina, confirmada pelo espectro de massa e pela comparação do mesmo com a biblioteca, tendo esta uma concentração de amitriptilina de $158,9 \pm 1,9$ μ g/L, sendo esta superior aos níveis terapêuticos encontrados em literatura.

Posteriormente efetuou-se uma comparação em forma de tabela entre o trabalho presente e alguns estudos anteriores, onde foi possível concluir principalmente que, a recuperação em urina deste trabalho está acima do indicado em estudos anteriores, sendo também visível que a gama linear é mais abrangente que alguns dos trabalhos registados, que tal como dito anteriormente é uma grande vantagem neste tipo de estudos analíticos.

Em suma, as questões e os objetivos propostos foram claramente alcançados, uma vez ter-se conseguido encontrar um sistema analítico para a análise de TCAs, as melhores condições para a microextração de TCAs e verificar a possível utilização do método em contexto clínico forense e de controlo *antidoping*.

Para trabalhos futuros, seria ainda possível otimizar outros parâmetros como a temperatura de extração. Sugere-se a validação desta metodologia em diferentes matrizes biológicas, nomeadamente, soro e plasma no sentido de demonstrar uma maior aplicabilidade da metodologia proposta. Por outro lado, será conveniente aumentar o número de antidepressivos abrangidos pelo método. Sugere-se ainda a tentativa de utilização de equipamentos de análise alternativos como técnicas *Tandem* (MS/MS).

6. Referências Bibliográficas

- [1] Página sobre Mental Disorders da World Health Organization. Publicada a 9 de abril de 2018. (Consultada a 19 de setembro de 2018). <http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/mental-disorders>.
- [2] P. Lovatt, Tricyclic antidepressants : pharmacological profile, *Nurse Prescr.* 9 (2011) 38–42.
- [3] A. Hecht, *Understanding Drugs: Antidepressants and Antianxiety Drugs*, 1st ed., Chelsea House Publications, New York, 2011.
- [4] Página sobre Relatório do Programa Nacional para a Saúde Mental 2017 da Direção-geral de Saúde. Publicado em Outubro de 2017. (Consultada a 23 de Janeiro de 2019). <https://www.dgs.pt/em-destaque/relatorio-do-programa-nacional-para-a-saude-mental-2017.aspx>.
- [5] O.J. Fasipe, Neuropharmacological Classification of Antidepressant Agents Based on their Mechanisms of Action, *Arch Med Heal. Sci.* 6 (2018) 81–94. doi:10.4103/amhs.amhs_7_18.
- [6] T.T. Zhang, R. Xue, L. Zhu, J. Li, Q.Y. Fan, B.H. Zhong, Y.F. Li, C.Y. Ye, Y.Z. Zhang, Evaluation of the analgesic effects of amoxetine, a novel potent serotonin and norepinephrine reuptake inhibitor, *Acta Pharmacol. Sin.* 37 (2016) 1154–1165. doi:10.1038/aps.2016.45.
- [7] J.M. Jarcho, E.A. Mayer, Z.K. Jiang, N.A. Feier, E.D. London, Pain, affective symptoms, and cognitive deficits in patients with cerebral dopamine dysfunction, *Pain.* 153 (2012) 744–754. doi:10.1016/j.pain.2012.01.002.
- [8] M. Raouf, A.J. Glogowski, J.J. Bettinger, J. Fudin, Serotonin-norepinephrine reuptake inhibitors and the influence of binding affinity (K_i) on analgesia, *J. Clin. Pharm. Ther.* 42 (2017) 513–517. doi:10.1111/jcpt.12534.
- [9] K. Corrie, J.G. Hardman, Mechanisms of drug interactions: pharmacodynamics and pharmacokinetics, *Anaesth. Intensive Care Med.* 18 (2017) 331–334. doi:10.1016/j.mpaic.2017.04.006.
- [10] J. Fan, I.A.M. de Lannoy, Pharmacokinetics, *Biochem. Pharmacol.* 87 (2014) 93–120. doi:10.1016/j.bcp.2013.09.007.
- [11] A.C. Moffat, M.D. Osselton, B. Widdop, J. Watts, *Clarke's Analysis of Drugs and Poisons*, 4th ed., London, 2011.
- [12] A. Al-Majed, A.H. Bakheit, R.M. Alharbi, H.A. Abdel Aziz, Mirtazapine, *Profiles Drug Subst. Excipients Relat. Methodol.* 43 (2018) 209–254. doi:10.1016/bs.podrm.2018.01.002.
- [13] M. V. Rudorfer, W.Z. Potter, Metabolism of tricyclic antidepressants, *Cell. Mol. Neurobiol.* 19 (1999) 373–409. doi:10.1023/A:1006949816036.
- [14] D. Remane, M.R. Meyer, D.K. Wissenbach, H.H. Maurer, Full validation and application of an ultra high performance liquid chromatographic-tandem mass spectrometric procedure for target screening and quantification of 34 antidepressants in human blood plasma as part of a comprehensive multi-analyte approach, *Anal. Bioanal. Chem.* 400 (2011) 2093–2107. doi:10.1007/s00216-011-4959-6.
- [15] M.G. Santos, I.M.C. Tavares, A.F. Barbosa, J. Bettini, E.C. Figueiredo, Analysis of tricyclic antidepressants in human plasma using online-restricted access molecularly imprinted solid phase extraction followed by direct mass spectrometry identification/quantification, *Talanta.* 163 (2017) 8–16. doi:10.1016/j.talanta.2016.10.047.
- [16] A. Mohebbi, S. Yaripour, M.A. Farajzadeh, M.R. Afshar Mogaddam, Combination of dispersive

- solid phase extraction and deep eutectic solvent-based air-assisted liquid-liquid microextraction followed by gas chromatography-mass spectrometry as an efficient analytical method for the quantification of some tricyclic antidepressants, *J. Chromatogr. A.* 1571 (2018) 84–93. doi:10.1016/j.chroma.2018.08.022.
- [17] M. Safari, M. Shalaei, Y. Yamini, M. Shakorian, E. Arkan, Magnetic framework composite as sorbent for magnetic solid phase extraction coupled with high performance liquid chromatography for simultaneous extraction and determination of tricyclic antidepressants, *Anal. Chim. Acta.* 1034 (2018) 204–213. doi:10.1016/j.aca.2018.06.023.
- [18] A.R. Breaud, R. Harlan, M. Kozak, W. Clarke, A rapid and reliable method for the quantitation of tricyclic antidepressants in serum using HPLC-MS / MS, *Clin. Biochem.* 42 (2009) 1300–1307. doi:10.1016/j.clinbiochem.2009.05.006.
- [19] M. Shamsipur, M. Mirmohammadi, High performance liquid chromatographic determination of ultra traces of two tricyclic antidepressant drugs imipramine and trimipramine in urine samples after their dispersive liquid-liquid microextraction coupled with response surface optimization, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 100 (2014) 271–278. doi:10.1016/j.jpba.2014.08.008.
- [20] T. Rosado, A. Gonçalves, A. Martinho, G. Alves, A.P. Duarte, F. Domingues, S. Silvestre, L. Breitenfeld, G. Víctor, O. Carlos, E. Gallardo, Simultaneous Quantification of Antidepressants and Metabolites in Urine and Plasma Samples by GC – MS for Therapeutic Drug Monitoring, *Chromatographia.* 80 (2017) 301–328. doi:10.1007/s10337-017-3240-3.
- [21] A. Mohebbi, M.A. Farajzadeh, S. Yaripour, M.R. Afshar, Determination of Tricyclic Antidepressants in Human Urine Samples by the Three – Step Sample Pretreatment Followed by HPLC – UV Analysis : an Efficient Analytical Method for Further Pharmacokinetic and Forensic Studies, *EXCLI J.* 17 (2018) 952–963.
- [22] M. Schulz, A. Schmoldt, Therapeutic and toxic blood concentrations of more than 800 drugs and other xenobiotics, *Pharmazie.* 58 (2003) 447–474.
- [23] L. Truta, A.L. Castro, S. Tarelho, P. Costa, M.G.F. Sales, H.M. Teixeira, Antidepressants detection and quantification in whole blood samples by GC – MS / MS , for forensic purposes, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 128 (2016) 496–503. doi:10.1016/j.jpba.2016.06.027.
- [24] M.A. Farajzadeh, M. Abbaspour, Development of new extraction method based on liquid-liquid-liquid extraction followed by dispersive liquid-liquid microextraction for extraction of three tricyclic antidepressants in plasma samples, *Biomed. Chromatogr.* 32 (2018) e4251. doi:10.1002/bmc.4251.
- [25] R. Ito, M. Ushiro, Y. Takahashi, K. Saito, T. Ookubo, Y. Iwasaki, Improvement and validation the method using dispersive liquid – liquid microextraction with in situ derivatization followed by gas chromatography – mass spectrometry for determination of tricyclic antidepressants in human urine samples, *J. Chromatogr. B.* 879 (2011) 3714–3720. doi:10.1016/j.jchromb.2011.10.012.
- [26] C. Xiong, J. Ruan, Y. Cai, Y. Tang, Extraction and determination of some psychotropic drugs in urine samples using dispersive liquid – liquid microextraction followed by high-performance liquid chromatography, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 49 (2009) 572–578. doi:10.1016/j.jpba.2008.11.036.
- [27] M.F. Dos Santos, C.C. Ferri, S.C. Seulin, V. Leyton, C.A.G. Pasqualucci, D.R. Muñoz, M. Yonamine, Determination of antidepressants in whole blood using hollow-fiber liquid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry, *Forensic Toxicol.* 32 (2014) 214–224. doi:10.1007/s11419-014-0226-9.
- [28] A. Esrafil, Y. Yamini, S. Shariati, Hollow fiber-based liquid phase microextraction combined with high-performance liquid chromatography for extraction and determination of some

- antidepressant drugs in biological fluids, *Anal. Chim. Acta.* 604 (2007) 127–133. doi:10.1016/j.aca.2007.10.012.
- [29] D. Montenarh, M.P. Wernet, M. Hopf, H.H. Maurer, P.H. Schmidt, A.H. Ewald, Quantification of 33 antidepressants by LC-MS/MS - Comparative validation in whole blood, plasma, and serum, *Anal. Bioanal. Chem.* 406 (2014) 5939–5953. doi:10.1007/s00216-014-8019-x.
- [30] C. Rodrigues, C. Alves, A.J. Santos-neto, C. Fernandes, F.M. Lan, Analysis of tricyclic antidepressant drugs in plasma by means of solid-phase microextraction-liquid chromatography-mass spectrometry, *J. Mass Spectrom.* 42 (2007) 1342–1347. doi:10.1002/jms.1288.
- [31] C. Alves, C. Fernandes, A. José, J.C. Rodrigues, M. Eugênia, C. Queiroz, F.M. Lanças, Optimization of the SPME Parameters and Its Online Coupling with HPLC for the Analysis of Tricyclic Antidepressants in Plasma Samples, *J. Chromatogr. Sci.* 44 (2006) 340–346.
- [32] A. Chaves, S. Silva, R. Queiroz, F. Lanças, M. Queiroz, Stir bar sorptive extraction and liquid chromatography with UV detection for determination of antidepressants in plasma samples, *J. Chromatogr. B.* 850 (2007) 295–302. doi:10.1016/j.jchromb.2006.11.042.
- [33] F. Mofazzeli, H. Asaadi Shirvan, F. Mohammadi, Extraction and determination of tricyclic antidepressants in real samples using air-dispersed liquid-liquid microextraction prior to gas chromatography and flame ionization detection, *J. Sep. Sci.* 41 (2018) 4340–4347. doi:10.1002/jssc.201800359.
- [34] S. Saeed, H. Davarani, A.M. Najarian, S. Nojavan, M. Tabatabaei, Analytica Chimica Acta Electromembrane extraction combined with gas chromatography for quantification of tricyclic antidepressants in human body fluids, *Anal. Chim. Acta.* 725 (2012) 51–56. doi:10.1016/j.aca.2012.02.048.
- [35] J.M.F. Nogueira, Stir-bar sorptive extraction: 15 years making sample preparation more environment-friendly, *TrAC - Trends Anal. Chem.* 71 (2015) 214–223. doi:10.1016/j.trac.2015.05.002.
- [36] A. Prieto, O. Basauri, R. Rodil, A. Usobiaga, L.A. Fernández, N. Etxebarria, O. Zuloaga, Stir-bar sorptive extraction: A view on method optimisation, novel applications, limitations and potential solutions, *J. Chromatogr. A.* 1217 (2010) 2642–2666. doi:10.1016/j.chroma.2009.12.051.
- [37] N.R. Neng, A.R.M. Silva, J.M.F. Nogueira, Adsorptive micro-extraction techniques-Novel analytical tools for trace levels of polar solutes in aqueous media, *J. Chromatogr. A.* 1217 (2010) 7303–7310. doi:10.1016/j.chroma.2010.09.048.
- [38] J.M.F. Nogueira, Novel sorption-based methodologies for static microextraction analysis: A review on SBSE and related techniques, *Anal. Chim. Acta.* 757 (2012) 1–10. doi:10.1016/j.aca.2012.10.033.
- [39] A. Kabir, M. Locatelli, H. Ulusoy, Recent Trends in Microextraction Techniques Employed in Analytical and Bioanalytical Sample Preparation, *Separations.* 4 (2017) 36. doi:10.3390/separations4040036.
- [40] K. Schmidt, I. Podmore, Solid Phase Microextraction (SPME) Method Development in Analysis of Volatile Organic Compounds (VOCS) as Potential Biomarkers of Cancer, *J. Mol. Biomark. Diagn.* 06 (2015). doi:10.4172/2155-9929.1000253.
- [41] J. Manuel, F. Nogueira, Extração Sortiva em Barra de Agitação (SBSE): uma metodologia inovadora para microextração estática, *Sci. Chromatogr.* 4 (2012) 259–269. doi:10.4322/sc.2012.019.
- [42] E. Baltussen, P. Sandra, F. David, C. Cramers, Stir Bar Sorptive Extraction (SBSE), a Novel Extraction Technique for Aqueous Samples: Theory and Principles, *J. Microcolumn Sep.* 11 (1999) 737–747. doi:10.1002/(SICI)1520-667X(1999)11:10<737::AID-MCS7>3.0.CO;2-4.

- [43] E. Baltussen, C.A. Cramers, P.J.F. Sandra, Sorptive sample preparation - A review, *Anal. Bioanal. Chem.* 373 (2002) 3–22. doi:10.1007/s00216-002-1266-2.
- [44] F. David, P. Sandra, Stir bar sorptive extraction for trace analysis, *J. Chromatogr. A* 1152 (2007) 54–69. doi:10.1016/j.chroma.2007.01.032.
- [45] A.L. Oenning, L. Morés, A.N. Dias, E. Carasek, A new configuration for bar adsorptive microextraction (BA μ E) for the quantification of biomarkers (hexanal and heptanal) in human urine by HPLC providing an alternative for early lung cancer diagnosis, *Anal. Chim. Acta* 965 (2017) 54–62. doi:10.1016/j.aca.2017.02.034.
- [46] A.N. Dias, A.C. da Silva, V. Simão, J. Merib, E. Carasek, A novel approach to bar adsorptive microextraction: Cork as extractor phase for determination of benzophenone, triclocarban and parabens in aqueous samples, *Anal. Chim. Acta* 888 (2015) 59–66. doi:10.1016/j.aca.2015.07.011.
- [47] F. Abujaber, S.M. Ahmad, N.R. Neng, R.C. Rodríguez Martín-Doimeadios, F.J. Guzmán Bernardo, J.M.F. Nogueira, Bar adsorptive microextraction coated with multi-walled carbon nanotube phases - Application for trace analysis of pharmaceuticals in environmental waters, *J. Chromatogr. A* 1600 (2019) 17–22. doi:10.1016/j.chroma.2019.04.035.
- [48] C. Almeida, J.M.F. Nogueira, Determination of steroid sex hormones in real matrices by bar adsorptive microextraction (BA μ E), *Talanta* 136 (2015) 145–154. doi:10.1016/j.talanta.2014.11.013.
- [49] C. Almeida, R. Strzelczyk, J.M.F. Nogueira, Improvements on bar adsorptive microextraction (BA μ E) technique-Application for the determination of insecticide repellents in environmental water matrices, *Talanta* 120 (2014) 126–134. doi:10.1016/j.talanta.2013.11.031.
- [50] C. Almeida, S.M. Ahmad, J.M.F. Nogueira, Bar adsorptive microextraction technique - application for the determination of pharmaceuticals in real matrices, *Anal. Bioanal. Chem.* 409 (2017) 2093–2106. doi:10.1007/s00216-016-0156-y.
- [51] D. Sparkman, Z. Penton, F. Kitson, *Gas Chromatography and Mass Spectrometry: A Practical Guide*, 2nd ed., Elsevier (Academic Press), Oxford, 2011.
- [52] G.D. Christian, P.K. Dasgupta, K.A. Schug, *Analytical chemistry*, 7th ed., John Wiley & Sons, Inc., 2014. doi:10.1103/PhysRevB.85.245131.
- [53] D.A. Skoog, J.E. Holler, S.R. Crouch, *Principles of Instrumental Analysis* (International student edition), 6.^a ed., Thomson Brooks/Cole, Belmont, CA, USA, 2007.
- [54] M.N. Uddin, V.F. Samanidou, I.N. Papadoyannis, Development and validation of an HPLC method for the determination of six 1,4-benzodiazepines in pharmaceuticals and human biological fluids, *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* 31 (2008) 1258–1282. doi:10.1080/10826070802019574.
- [55] S.M. Ahmad, J.M.F. Nogueira, High throughput bar adsorptive microextraction : A novel cost-effective tool for monitoring benzodiazepines in large number of biological samples, *Talanta* 199 (2019) 195–202. doi:10.1016/j.talanta.2019.02.004.
- [56] J.K. Schneider, *Utilização De Biomassas Brasileiras Para Produção De Carvão Ativado De Alta Qualidade : Caracterização E Aplicação Como Adsorvente*, UFRGS, Porto Alegre, Brasil, 2018.
- [57] S.M. Ahmad, C. Almeida, N.R. Neng, J.M.F. Nogueira, Bar adsorptive microextraction (BA μ E) coated with mixed sorbent phases-Enhanced selectivity for the determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs in real matrices in combination with capillary electrophoresis, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 1008 (2016) 115–124. doi:10.1016/j.jchromb.2015.11.018.

- [58] S.M. Ahmad, C. Almeida, N.R. Neng, J.M.F. Nogueira, Application of bar adsorptive microextraction (BA μ E) for anti-doping control screening of anabolic steroids in urine matrices, *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* 969 (2014) 35–41. doi:10.1016/j.jchromb.2014.07.040.
- [59] A.H. Ide, J.M.F. Nogueira, New-generation bar adsorptive microextraction (BA μ E) devices for a better eco-user-friendly analytical approach–Application for the determination of antidepressant pharmaceuticals in biological fluids, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 153 (2018) 126–134. doi:10.1016/j.jpba.2018.02.001.
- [60] F.J. Camino-sánchez, R. Rodríguez-Gómez, A. Zafra-Gómez, A. Santos-Fandila, J.L. Vilchez, Stir bar sorptive extraction: Recent applications, limitations and future trends, *Talanta*. 130 (2014) 388–399. doi:10.1016/j.talanta.2014.07.022.
- [61] N.R. Neng, S.M. Ahmad, H. Gaspar, J.M.F. Nogueira, Determination of mitragynine in urine matrices by bar adsorptive microextraction and HPLC analysis, *Talanta*. 144 (2015) 105–109. doi:10.1016/j.talanta.2015.05.038.
- [62] A.H. Ide, S.M. Ahmad, N.R. Neng, J.M.F. Nogueira, Enhancement for trace analysis of sulfonamide antibiotics in water matrices using bar adsorptive microextraction (BA μ E), *J. Pharm. Biomed. Anal.* 129 (2016) 593–599. doi:10.1016/j.jpba.2016.07.022.
- [63] S.M. Ahmad, A.H. Ide, N.R. Neng, J.M.F. Nogueira, Application of bar adsorptive microextraction to determine trace organic micro-pollutants in environmental water matrices, *Int. J. Environ. Anal. Chem.* 97 (2017) 484–498. doi:10.1080/03067319.2017.1324024.
- [64] N.R. Neng, J.M.F. Nogueira, Monitoring trace levels of hydroxy aromatic compounds in urine matrices by bar adsorptive microextraction (BA μ E), *Anal. Methods*. 9 (2017) 5260–5265. doi:10.1039/c7ay01410d.
- [65] C. Almeida, S.M. Ahmad, J.M.F. Nogueira, Bar adsorptive microextraction technique - application for the determination of pharmaceuticals in real matrices, *Anal. Bioanal. Chem.* 409 (2017) 2093–2106. doi:10.1007/s00216-016-0156-y.
- [66] A.H. Ide, J.M.F. Nogueira, Hollow fiber microextraction: a new hybrid microextraction technique for trace analysis, *Anal. Bioanal. Chem.* 410 (2018) 2911–2920. doi:10.1007/s00216-018-0971-4.
- [67] J.B. Quintana, R. Rodil, S. Muniategui-Lorenzo, P. López-Mahía, D. Prada-Rodríguez, Multiresidue analysis of acidic and polar organic contaminants in water samples by stir-bar sorptive extraction – liquid desorption – gas chromatography – mass spectrometry, 1174 (2007) 27–39. doi:10.1016/j.chroma.2007.07.088.
- [68] P. Amaratunga, C. Thomas, B.L. Lemberg, D. Lemberg, Quantitative measurement of XLR11 and UR-144 in oral fluid by LC-MS-MS, *J. Anal. Toxicol.* 38 (2014) 315–321. doi:10.1093/jat/bku040.
- [69] K.W. Bleszel, B.C. Rudy, B.Z. Senkowski, Amitriptyline Hydrochloride, *Anal. Profiles Drug Subst.* 3 (1974) 127–148. doi:10.1016/B978-0-323-24485-5.00080-2.
- [70] D.N. Kender, R.E. Schiesswohl, Imipramine Hydrochloride, *Anal. Profiles Drug Subst.* 14 (1985).
- [71] O. Drzyzga, Diphenylamine and derivatives in the environment: A review, *Chemosphere*. 53 (2003) 809–818. doi:10.1016/S0045-6535(03)00613-1.
- [72] E. Ferrari Júnior, E.D. Caldas, Simultaneous determination of drugs and pesticides in postmortem blood using dispersive solid-phase extraction and large volume injection-programmed temperature vaporization-gas chromatography-mass spectrometry, *Forensic Sci. Int.* 290 (2018) 318–326. doi:10.1016/j.forsciint.2018.07.031.

- [73] S.M.R. Wille, P. Van Hee, H.M. Neels, C.H. Van Peteghem, W.E. Lambert, Comparison of electron and chemical ionization modes by validation of a quantitative gas chromatographic-mass spectrometric assay of new generation antidepressants and their active metabolites in plasma, *J. Chromatogr. A.* 1176 (2007) 236–245. doi:10.1016/j.chroma.2007.10.096.
- [74] T. Gunnar, S. Mykkänen, K. Ariniemi, P. Lillsunde, Validated semiquantitative/quantitative screening of 51 drugs in whole blood as silylated derivatives by gas chromatography-selected ion monitoring mass spectrometry and gas chromatography electron capture detection, *J. Chromatogr. B.* 806 (2004) 205–219. doi:10.1016/j.jchromb.2004.04.005.
- [75] C. Almeida, J.M.F. Nogueira, Comparison of the selectivity of different sorbent phases for bar adsorptive microextraction-Application to trace level analysis of fungicides in real matrices, *J. Chromatogr. A.* 1265 (2012) 7–16. doi:10.1016/j.chroma.2012.09.047.
- [76] C. Almeida, R. Strzelczyk, J.M.F. Nogueira, Improvements on bar adsorptive microextraction (BA μ E) technique-Application for the determination of insecticide repellents in environmental water matrices, *Talanta.* 120 (2014) 126–134. doi:10.1016/j.talanta.2013.11.031.
- [77] N. Unceta, A. Ugarte, A. Sánchez, A. Gómez-Caballero, M.A. Goicolea, R.J. Barrio, Development of a stir bar sorptive extraction based HPLC-FLD method for the quantification of serotonin reuptake inhibitors in plasma, urine and brain tissue samples, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 51 (2010) 178–185. doi:10.1016/j.jpba.2009.07.015.
- [78] M.T. Jafari, M. Saraji, H. Sherafatmand, Electrospray ionization-ion mobility spectrometry as a detection system for three-phase hollow fiber microextraction technique and simultaneous determination of trimipramine and desipramine in urine and plasma samples, *Anal. Bioanal. Chem.* 399 (2011) 3555–3564. doi:10.1007/s00216-011-4730-z.
- [79] A.H. Ide, Metodologias inovadoras baseadas em microextração estática para análise vestigial de contaminantes emergentes em matrizes reais, Universidade de Lisboa, 2018.
- [80] Z. Aladaghlo, Olfaghar, A. Reza, F. Zavareh, K.S. Hasheminasab, Application of electromembrane extraction followed by corona discharge ion mobility spectrometry analysis as a fast and sensitive technique for determination of tricyclic antidepressants in urine samples., *Microchem. J.* 129 (2016) 41–48. doi:10.1016/j.microc.2016.05.013.
- [81] C. Mansilha, A. Melo, H. Rebelo, I.M.P.L.V.O. Ferreira, O. Pinho, V. Domingues, C. Pinho, P. Gameiro, Quantification of endocrine disruptors and pesticides in water by gas chromatography-tandem mass spectrometry. Method validation using weighted linear regression schemes, *J. Chromatogr. A.* 1217 (2010) 6681–6691. doi:10.1016/j.chroma.2010.05.005.
- [82] F.I.C.C. Martins, P.G.A. Barbosa, G.J. Zocolo, R.F. do Nascimento, Method Validation Using Normal and Weighted Linear Regression Models for Quantification of Pesticides in Mango (*Mangifera indica* L.) Samples, *Chromatographia.* 81 (2018) 677–688. doi:10.1007/s10337-018-3483-7.
- [83] C.P. Da Silva, E.S. Emídio, M.R.R. De Marchi, Method validation using weighted linear regression models for quantification of UV filters in water samples, *Talanta.* 131 (2015) 221–227. doi:10.1016/j.talanta.2014.07.041.
- [84] M. Prata, A. Ribeiro, D. Figueirinha, T. Rosado, D. Oppolzer, J. Restolho, A.R.T.S. Araújo, S. Costa, M. Barroso, E. Gallardo, Determination of Opiates in Whole Blood Using Microextraction By Packed Sorbent and Gas Chromatography-Tandem Mass Spectrometry, *J. Chromatogr. A.* (2019) 1–10. doi:10.1016/j.chroma.2019.05.021.
- [85] A. Raffo, A.D. Aloise, A.L. Magrì, C. Leclercq, Quantitation of *trans*-cinnamaldehyde, safrole and myristicin in cola-flavoured soft drinks to improve the assessment of their dietary exposure, *Food Chem. Toxicol.* 59 (2013) 626–635. doi:10.1016/j.fct.2013.06.058.
- [86] P.G.A. Barbosa, F.I.C.C. Martins, L.K. Lima, M.A.L. Milhome, R.M. Cavalcante, R.F. do

- Nascimento, Statistical Analysis for Quality Adjustment of the Analytical Curve for Determination of Pesticide Multiresidue in Pineapple Samples, *Food Anal. Methods*. 11 (2018) 466–478. doi:10.1007/s12161-017-1017-9.
- [87] N.I.P. Valente, S. Tarelho, A.L. Castro, A. Silvestre, H.M. Teixeira, Analysis of organophosphorus pesticides in whole blood by GC-MS- μ ECD with forensic purposes, *J. Forensic Leg. Med.* 33 (2015) 28–34. doi:10.1016/j.jflm.2015.03.006.
- [88] E. Cognard, S. Rudaz, C. Staub, Analysis of cocaine and three of its metabolites in hair by gas chromatography-mass spectrometry using ion-trap detection for CI / MS / MS, *J. Chromatogr. B*. 826 (2005) 17–25. doi:10.1016/j.jchromb.2005.07.043.
- [89] Y. Gaillard, F. Billault, P. Gilbert, Meprobamate overdose : a continuing problem Sensitive GC-MS quantitation after solid phase extraction in 19 fatal cases, *Forensic Sci. Int.* 86 (1997) 173–180.
- [90] E. Rutkowska, B. Lozowicka, P. Kaczynski, Three approaches to minimize matrix effects in residue analysis of multiclass pesticides in dried complex matrices using gas chromatography tandem mass spectrometry, *Food Chem.* 279 (2019) 20–29. doi:10.1016/j.foodchem.2018.11.130.
- [91] A. Ishii, R. Kurihara, T. Kojima, T. Sano, Y. Mizuno, Y. Yamakawa, Y. Katsumata, Sensitive determination of mianserin and setiptiline in body fluids by gas chromatography with surface ionization detection (GC-SID), *Leg. Med.* 2 (2000) 115–118.

I. Anexo 1

i. Cromatografia

A cromatografia é um grupo de métodos diversificado que permite a separação, identificação, e determinação de componentes semelhantes de uma mistura complexa. Em todas as separações cromatográficas a amostra é dissolvida numa fase móvel, que pode ser, um gás, um líquido ou um fluido supercrítico. Esta é depois forçada por uma fase estacionária imiscível que está fixa numa coluna ou superfície sólida. As duas fases são escolhidas para que os componentes da amostra se distribuam em diferentes níveis entre a fase móvel e estacionária. O equilíbrio de distribuição envolvido na cromatografia pode ser descrito por equações simples que envolvem a transferência de um analito entre as fases móvel e estacionária. A constante de equilíbrio (K_c) é a constante de distribuição de uma espécie entre as duas fases. Esta pode ser expressa com a concentração analítica molar do soluto na fase estacionária (c_s), e com a concentração analítica molar na fase móvel (c_M), na equação I.1 [53].

$$K_c = \frac{c_s}{c_M} \quad \text{I.1}$$

Apesar de K ser fundamental para as separações cromatográficas não pode ser medida. O que é medido é o tempo de retenção (t_R), o tempo necessário para o analito chegar ao detetor após a injeção da amostra., pode ser expresso de acordo com: o tempo morto (t_M), este é o tempo que espécies não retidas demoram a chegar ao detetor, este proporciona uma medida da taxa média de migração da fase móvel e o tempo que o analito passa retido na fase estacionária (t_S). Assim t_R é expresso pela equação I.2 [53].

$$t_R = t_S + t_M \quad \text{I.2}$$

O fator de retenção (k) é uma quantidade experimental vastamente utilizada para comparar a taxa de migração de solutos na coluna. Este é muito útil pois não depende da geometria da coluna ou da razão volumétrica. Assim, para dada combinação de soluto, fase móvel e fase estacionária o fator de retenção será igual. Este pode ser expresso pela equação I.3, onde t'_R é o tempo de retenção ajustado [53].

$$k = \frac{t_R - t_M}{t_M} = \frac{t'_R}{t_M} \quad \text{I.3}$$

Existe ainda o fator de seletividade (α) de uma coluna para dois solutos (por exemplo, soluto A e soluto B). Este é definido pelo fator de retenção da espécie mais fortemente retida (k_B) e pelo fator de retenção da espécie mais rapidamente eluída (k_A), de acordo com a equação I.4 [53].

$$\alpha = \frac{k_B}{k_A} \quad \text{I.4}$$

A eficiência de uma coluna cromatográfica é amplamente medida quantitativamente por dois termos, a altura de pratos (H) e o número de pratos teóricos (N), estes estão relacionados matematicamente pelo comprimento da coluna (L) segundo a equação I.5 [53].

$$N = \frac{L}{H} \quad \text{I.5}$$

Quanto maior N e menor H , a eficiência de uma coluna cromatográfica aumenta. A enorme variação encontrada em eficiências de colunas resulta das diferenças de tipo de coluna, e de fase estacionária e móvel. Pode variar entre as poucas centenas e os muitos milhares. N pode ainda ser calculado por outra equação equivalente que recorre a medidas temporais, tais como t_R e a largura da base de um pico no cromatograma (W), tal como indicado na equação I.6 [53].

$$N = 16 \left(\frac{t_R}{W} \right)^2 \quad \text{I.6}$$

É de notar que estas equações são apenas aproximações e só se verificam partindo do princípio de que os picos têm a forma de uma gaussiana [53].

N e H são amplamente utilizados tanto na literatura como por fabricantes, e são bastante úteis na comparação do poder de separação e da eficiência entre colunas. Contudo para que estes números sejam significativos na comparação de colunas é essencial que sejam determinados com o mesmo composto. A separação cromatográfica é otimizada variando condições experimentais até os componentes de uma mistura se separarem completamente no menor intervalo de tempo possível. A resolução (R_S) fornece-nos uma medida quantitativa da capacidade da coluna de separar dois analitos. É útil uma relação matemática entre a R_S e os fatores de retenção dos dois solutos (k_A e k_B), o fator de seletividade (α), e o número de pratos teóricos (N) da coluna. Assim obtemos a equação I.7 [53].

$$R_S = \frac{\sqrt{N}}{4} \left(\frac{\alpha - 1}{\alpha} \right) \left(\frac{k_B}{1 + k_B} \right) \quad \text{I.7}$$

ii. Cromatografia gasosa

O princípio básico de operação da cromatografia gasosa, introduzido em 1952, envolve a volatilização da amostra numa entrada ou injetor aquecido de um cromatógrafo gasoso, seguido da separação dos componentes da mistura numa coluna especialmente preparada para o propósito. Apenas compostos que possam ser vaporizados sem se decomporem são adequados para a análise em GC. Os compostos que podem ser analisados por GC incluem a maioria dos solventes e pesticidas, numerosos componentes em sabores, óleos essenciais, combustíveis de hidrocarbonetos, e ainda muitas drogas. Há outras classes de compostos que frequentemente necessitam de derivatização para aumentar a sua

volatilização, tais como, ácidos, aminoácidos, aminas, amidas, drogas não voláteis, sacarídeos, e esteroides [51].

Um dos componentes da técnica, é o gás de arraste, também chamado de fase móvel, normalmente é Hidrogénio ou Hélio. Este é utilizado para transferir a amostra desde o injetor até ao detetor, ou espectrómetro de massa através da coluna. A maioria das colunas utilizadas são tubos capilares com a parede interna revestida pela fase estacionária. Assim a separação dos componentes é determinada pela afinidade de cada componente com a fase móvel e a fase estacionária, tendo menos afinidade com a fase estacionária irá eluir primeiro. As características principais dos cromatógrafo gasosos são os fornos separados que aquecem individualmente os injetores, a coluna, cada detetor e a linha de transferência para o espectrómetro de massa. A temperatura pode ser aumentada a um ritmo regular durante a separação dos compostos da amostra [51].

a. Injetores para amostras líquidas

A maioria das amostras para análise em GC consistem em solventes purificados que contêm os analitos de interesse, este tipo de amostra é introduzido no injetor do GC utilizando uma seringa. Normalmente é injetado cerca de 1 µL. O injetor mais comum e antigo é o injetor aquecido *split/splitless* que pode ter o modo *split* e *splitless*. A decisão entre os dois modos depende da concentração dos analitos na amostra. O modo *split* é utilizado para amostras puras, ou amostras onde os analitos estão dissolvidos num solvente, mas a relativamente alta concentração, geralmente os compostos de interesse estão presentes a concentrações maiores de 100 µg mL⁻¹. O modo *splitless* é utilizado para amostras que contêm os analitos apenas a níveis vestigiais. No modo *split* a amostra é vaporizada e apenas uma pequena porção da amostra é enviada para o início da coluna GC. Enquanto que no modo *splitless* toda a amostra é analisada. Em ambos os modos de injeção esta é quente e isotérmica, ou seja, o injetor é programado para uma temperatura quente o suficiente para vaporizar o solvente e os analitos da amostra, e esta temperatura mantém-se constante durante toda a corrida [51].

Existem ainda injetores vaporizadores de temperatura programável (PTV, do inglês *Programmable-temperature vaporizing*). Este tipo de injetor está num forno específico para o mesmo, que é capaz de arrefecer e de aquecer o injetor. Dentro deste tipo de injetores existem ainda os injetores na coluna e os injetores multifunção PTV. No primeiro a amostra é injetada diretamente na coluna. Um injetor multifunção PTV pode também funcionar em diversos modos tais como, injeção direta, *split* e *splitless* frio, e ainda modo de grande volume [51].

Neste último modo, o volume das amostras pode variar entre 5 µL e 100 µL. Este modo tem como objetivo melhorar os limites de deteção dos analitos que estejam presentes em concentrações muito baixas. É ideal que os compostos de interesse tenham um ponto de ebulição superior àquele do solvente para impedir que haja perdas quando o solvente é ventilado. A maioria do solvente é ventilado, enquanto os analitos de alto ponto de ebulição são retidos no filtro. Após um tempo determinado de espera, o *splitter* é fechado e o injetor é rapidamente aquecido, transferindo os analitos para a coluna. Passados poucos minutos, o *splitter* é aberto e a coluna é programada até todos os compostos da amostra eluírem. Esta técnica requer que se despenda algum tempo a determinar as condições ótimas para cada análise. As impurezas no solvente serão também mais visíveis [51].

b. Colunas

Tal como referido a separação dos compostos em cromatografia gasosa acontece no interior de um tubo oco que contém a fase estacionária, a que se chama coluna. Os componentes da amostra são transportados para a coluna pelo gás de arraste, que é a fase móvel, sendo posteriormente seletivamente retardados pela fase estacionária. Esta está colocada no interior do forno, o qual é programado para aumentar a temperatura de acordo com o decidido experimentalmente. Este aumento é de normalmente

entre 4 a 20 °C/min, para que os compostos com ponto de ebulição mais elevados e compostos que tenham mais afinidade com a fase estacionária sejam libertados da mesma [51].

Existem diversos tipos de colunas para uso em cromatografia gasosa. Como por exemplo, colunas tubulares abertas com paredes revestidas (WCOT, do inglês *wall-coated open-tubular columns*). Esta é uma coluna de sílica fundida, que consiste num dióxido de sílica altamente purificado que tem a parede exterior revestida com um material poli-imida, a superfície interior é revestida com uma fina camada uniforme de um polímero, existindo vários polímeros disponíveis. Outro tipo de coluna tubular aberta, não tão normalmente utilizado é a coluna tubular aberta com camada porosa (PLOT, do inglês *porous-layer open-tubular column*). Estas têm uma camada sólida de polímero na parede interna da coluna, e são mais utilizadas para separar gases permanentes. Existe uma coluna que é uma variação da anterior, esta denomina-se coluna tubular aberta com suporte recoberto, na qual a camada porosa consiste em partículas de suporte revestidas com uma fase líquida que é depositada de uma suspensão. Em alternativa das colunas capilares existem as colunas empacotadas que não são tão utilizadas com a exceção de algumas aplicações especializadas [51].

Existem ainda diversas opções na programação da temperatura da coluna. É possível manter a temperatura constante em toda a corrida, corrida isotérmica a temperatura pode ser aumentada a um ritmo constante a temperatura pode aumentar a ritmos diferentes a tempos diferentes durante a corrida ou, por último, a temperatura pode ser constante em diferentes períodos de tempo durante a corrida. Quando a amostra é constituída por muitos componentes de uma vasta gama de pontos de ebulição, a programação da variação de temperatura é necessária para separar todos os componentes da mistura [51].

iii. Interface GC-MS

A interface GC-MS compreende a secção do instrumento que começa no fim da coluna do cromatógrafo gasoso e estende-se até à entrada da fonte iónica do espectrómetro de massa. Inicialmente o gás da coluna está numa pressão entre 200 kPa e 700 kPa e a pressão na fonte de ionização eletrónica está a, aproximadamente, 10^{-1} Pa. Na maioria das aplicações a interface consiste num tubo de metal aquecido equipado com um controlador de temperatura [51].

iv. Espetrometria de massa

Em GC-MS, o espectrómetro de massa ioniza a fase gasosa eluída da coluna GC assim que este entra no espectrómetro de massa. A fase gasosa contém a fase móvel, quer sejam moléculas de Hidrogénio ou átomos de Hélio moléculas do analito componentes voláteis da matriz que eluíram com o analito e moléculas que se tenham separado da fase estacionária da coluna GC, devido à decomposição da fase estacionária [51].

Os espectrómetros de massa separam os iões de acordo com a sua razão massa/carga (m/z), assim dado que a vasta maioria dos iões formados em GC-MS têm apenas uma carga, considera-se que o valor de m/z dos iões formados em GC-MS é a massa do ião. Apenas iões de hidrocarbonetos aromáticos submetidos a ionização eletrónica (EI) irão formar iões de cargas duplas, estes serão de abundâncias baixas quando comparados com iões de apenas uma carga da mesma massa. Após a formação inicial de iões e a sua subsequente fragmentação, estes são expelidos da fonte de iões com energia constante para o analisador de m/z . A instrumentação de GC-MS utiliza EI, ionização química (CI, do inglês *chemical ionization*), ionização negativa com captura de eletrões (ECNI, do inglês *electron capture negative*

ionization), ionização de campo (FI, do inglês *field ionization*), e ainda a menos utilizada ionização química à pressão atmosférica (APCI, do inglês *atmospheric pressure chemical ionization*) [51].

A mais utilizada EI permite formar íons moleculares de carga positiva (M^+), tal como em FI, pelo contrário ECNI forma íons moleculares negativos (M^-). Estes íons têm composição elementar igual à molécula originária mas têm um eletrão a mais ou a menos do que a molécula inicial. Por outro lado a CI e a APCI formam moléculas protonadas (MH^+), íons desprotonados ($[M-H]^-$), ou íons adutos ($[M+C_2H_5]^+$ ou $[M+Cl]^+$). Todos estes íons formados por CI e APCI têm composições elementares diferentes, assim têm massas diferentes da molécula original. A ionização eletrónica (EI) produz íons moleculares muito energéticos, dependendo da estrutura destes, um número significativo irá sofrer fragmentação. Íons moleculares diferentes podem produzir íons fragmentados com diferentes valores m/z e diferentes composições elementares. A formação e a subsequente deteção destes íons fragmentados e suas abundâncias produz o espectro de massa EI característico. Por vezes o pico M^+ não é visível no espectro de massa dado que os íons moleculares formados por EI são muito energéticos [51].

Os dados obtidos após uma análise GC-MS são espectros de massa. Estes são adquiridos sucessivamente a um ritmo constante. O valor de x representa o valor de m/z de um ião e o y representa a abundância desse ião, normalmente uma intensidade relativa [51].

a. Sistema de vácuo

Uma característica da espectrometria de massa é o seu funcionamento sob uma pressão muito baixa, ou seja, em vácuo. Isto deve-se à necessidade dos íons que vão da fonte de íons através do analisador de m/z para o detetor estarem em movimento livre, assim a sua trajetória deve ser determinada apenas pelos campos elétricos ou magnéticos utilizados para os separar de acordo com os seus valores de m/z . É também necessário que os íons não colidam com qualquer outra matéria que poderia causar mudança de direção ou a sua quebra. Dado que o GC-MS é um sistema dinâmico com constante entrada de gás (a fase móvel do GC), para manter a pressão adequada o gás introduzido deve ser continuamente removido. Assim a função do sistema de vácuo é remover o gás que entra ao mesmo tempo que a pressão é mantida ao nível desejado. O sistema de vácuo é composto por duas partes uma componente de baixo vácuo e uma de alto vácuo. A primeira é uma bomba que produz o vácuo primário (aproximadamente 10^{-1} Pa) conhecida como *fore pump* ou *roughing pump*, enquanto que o sistema de alto vácuo diminuiu a pressão até aproximadamente 10^{-3} Pa ou menos. A componente de alto vácuo pode ser uma bomba turbo molecular ou uma bomba difusora [51].

b. Tipos de ionização

Tal como referido o tipo de ionização mais utilizado em GC-MS é a EI, dado que este é um processo muito energético que resulta em íons moleculares (M^+) que têm uma grande energia interna. Estes querem atingir um estado de energia mais baixo e irão fragmentar-se resultando num espectro de massa com vários picos. As outras técnicas de ionização também já referidas, são chamadas técnicas de ionização suaves dado que resultam principalmente em íons que representam a molécula intacta, não produzindo muitos fragmentos [51].

A EI envolve a interação de uma nuvem de gás com baixa pressão (aproximadamente 10^{-1} Pa) com eletrões que foram acelerados através de um campo elétrico de 70 eV. O uso de 70 eV é convenção, isto garante que a máxima fragmentação é atingida e utilizando o mesmo valor é assegurado que o espectro EI de um composto será igual noutro instrumento, esta reprodutibilidade é o que permite a criação e uso de diferentes bases de dados de espectros de massa [51].

c. Tipos de analisador m/z

Existem quatro tipos de analisadores m/z mais utilizados em GC-MS: quadrupólo (QMF, do inglês *Quadrupole Mass Filter*), armadilha de iões (QIT, do inglês *Quadrupole Ion Trap*), tempo de voo (TOF, do inglês *Time-of-Flight*) e sector magnético [51].

Desde o início da sua comercialização no fim dos anos 60, o quadrupólo tornou-se a escolha mais comum para GC-MS. O quadrupólo era capaz de aquisição espectral mais rápida do que aparelhos magnéticos. Tinha uma resolução constante em toda a escala m/z, o que lhe conferia uma vantagem em relação ao TOF e a instrumentos magnéticos da altura e era ainda de baixo custo quando comparado com os restantes. Desde aí que manteve a popularidade. O quadrupólo utiliza corrente contínua (dc, do inglês *direct current*) e alternada (ac, do inglês *alternating current*) na forma de um campo elétrico de frequência rádio para separar os iões de acordo com os seus valores m/z de um feixe de eletrões de todos os valores de m/z que corre continuamente da fonte de iões para o detetor de iões. Este tipo de analisador, representado na Figura I.1, é composto por 4 pólos (superfícies condutoras). Estes pólos são 4 varas que estão dispostas de forma a que duas estejam frente a frente no eixo do x e duas frente a frente no eixo do y, também como representado na Figura I.1. Ao aplicar potencial dc positivo a um par de pólos e potencial dc negativo a outro par, e em simultâneo aplicar uma voltagem de frequência de rádio fixa em todos os pólos, é criado um campo alternado que irá direccionar os iões enquanto estes vão ao longo do eixo z do aparelho [51].

O espectro de massa é obtido ao manter a amplitude da razão entre a corrente contínua e a frequência de rádio constante e aumentando as duas amplitudes em simultâneo [51].

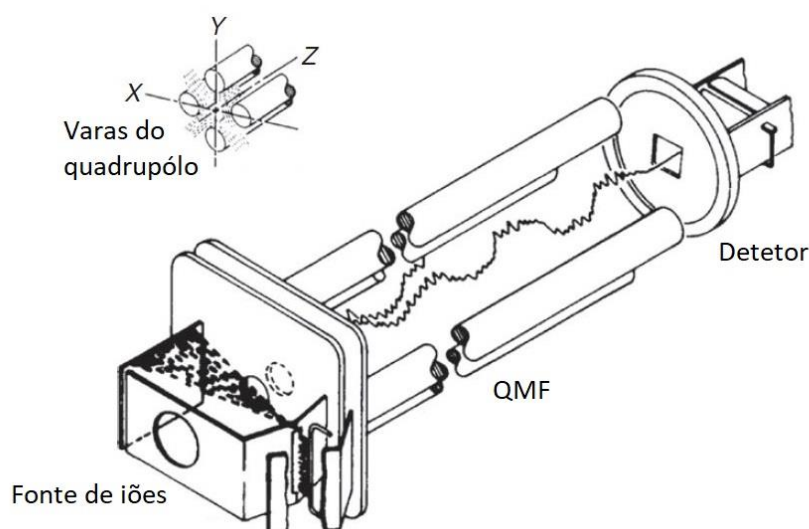


Figura I.1 - Representação esquemática de um analisador de m/z do tipo quadrupólo [51].

d. Detecção de iões

Assim que os iões saem do analisador atingem um detetor que gera uma corrente de eletrões ou fótons que produz um sinal. A intensidade do sinal é diretamente proporcional à abundância dos iões com determinado valor de m/z [51].

A libertação inicial de eletrões ou fótons é uma função da energia cinética dos iões ($E_k = mv^2/2$), e no caso de um espectrómetro de massa com quadrupólo a energia cinética é de, aproximadamente, 15 eV ou menos. Esta é uma das razões para existir discriminação para massas maiores, ou seja, a força do

sinal para o mesmo número de íons de dado valor m/z é diferente quando para íons de diferente valor de m/z , discriminação que não existe em espectrómetros de massa nos quais a energia cinética dos íons é muito maior como instrumentos TOF e setor magnético. Por exemplo, neste último instrumento referido a energia cinética dos íons varia entre 1 a 5 keV. Existe uma maneira de corrigir este problema, colocando um dínodo à saída do analisador de m/z para aumentar a energia cinética dos íons de todos os valores de m/z antes destes atingirem o detetor [51].

e. Aquisição de dados

A aquisição de dados pode ser referida de duas formas diferentes, medições contínuas de espectros e SIM. O termo medição contínua opõe-se ao termo modo *scan* para o processo onde espectros são obtidos sucessivamente numa gama m/z específica, isto porque não existe nenhum processo de *scan* em instrumentos com TOF e QIT. O termo SIM refere-se ao processo onde íons de determinado m/z são monitorizados para uma porção da informação obtida num ciclo de tempo [51].

SIM é limitado para instrumentos que medem a corrente de íons para valores específicos de m/z em determinados períodos de tempo durante a aquisição de dados, estes instrumentos são o QMF e o setor magnético. Ao ser possível despendar maior parte do tempo do ciclo de aquisição de dados em íons de alguns valores de m/z , mais destes íons são detetados, dando assim um sinal mais forte. Logo será possível obter um limite de detecção mais baixo. Assim a técnica SIM é utilizada para obter limites de detecção menores para os analitos alvo em análises quantitativas. Para que a técnica seja eficaz, não devem ser monitorizados íons de mais de 8 valores de m/z diferentes no mesmo ciclo [51].

O atraso entre a injeção da amostra para a coluna GC e o momento em que aquisição de dados começa é muito importante. Durante este período, o filamento da fonte de íons e o detetor estão desligados. O primeiro componente a ser eluído é o solvente, que deverá passar sem ser retido, o volume de solvente normalmente é muito superior ao de qualquer analito. Ao desligar o filamento e o detetor, os íons que possivelmente se possam formar nessa altura não irão danificar o filamento nem ter um impacto negativo na vida do detetor [51].

II. Anexo 2

O cálculo da média (\bar{x}), desvio padrão (σ) e a aplicação do método dos mínimos quadrados (linearização), foram efetuados com recurso às funções pré-definidas no software Microsoft Excel. No caso do desvio padrão relativo (RSD) utilizou-se a seguinte relação:

$$RSD = \frac{\sigma}{\bar{x}} \times 100 \quad \text{II.1}$$

O cálculo da recuperação foi efetuado através da seguinte expressão:

$$\text{Recuperação} = \frac{A_{\text{pico do analito na amostra}}/A_{\text{pico do padrão interno no padrão}}}{A_{\text{pico do analito no padrão}}/A_{\text{pico do padrão interno no padrão}}} \times 100 \quad \text{II.2}$$

III. Anexo 3

i. Espectros de massa dos compostos estudados obtidos.

a. Espectro de massa da amitriptilina

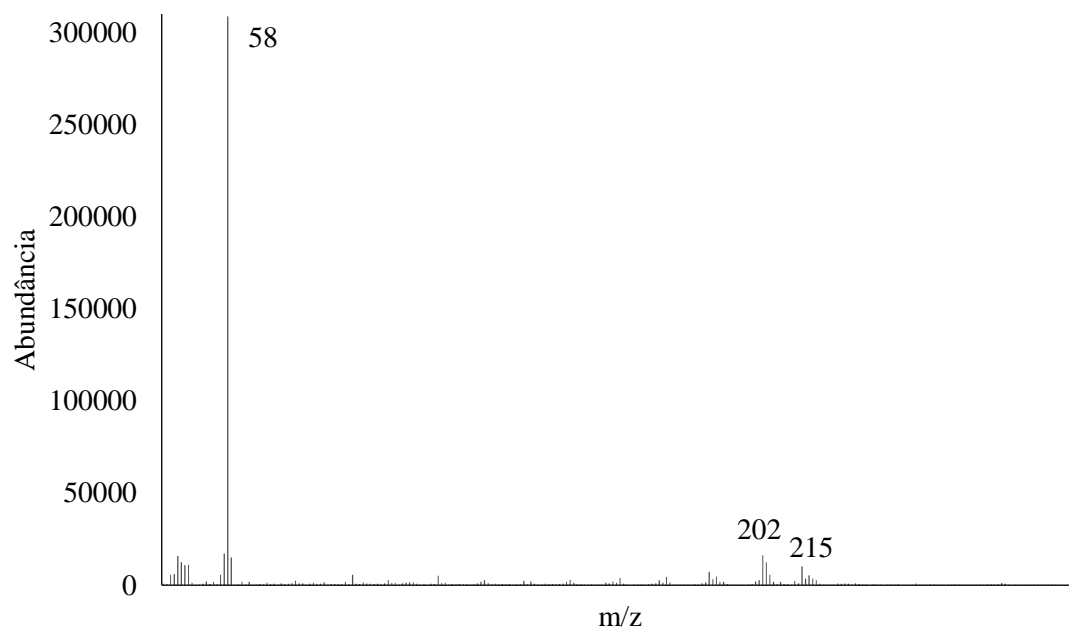


Figura III.1 - Espectro de massa característico da amitriptilina.

b. Espectro de massa da mianserina

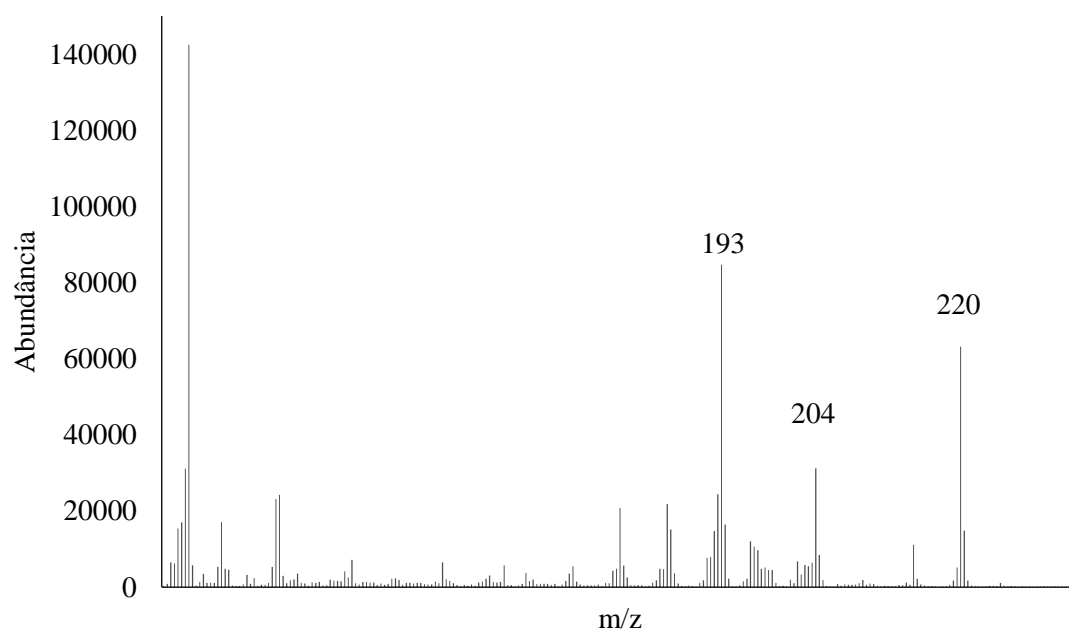


Figura III.2 - Espectro de massa característico da mianserina.

c. Espectro de massa da trimipramina

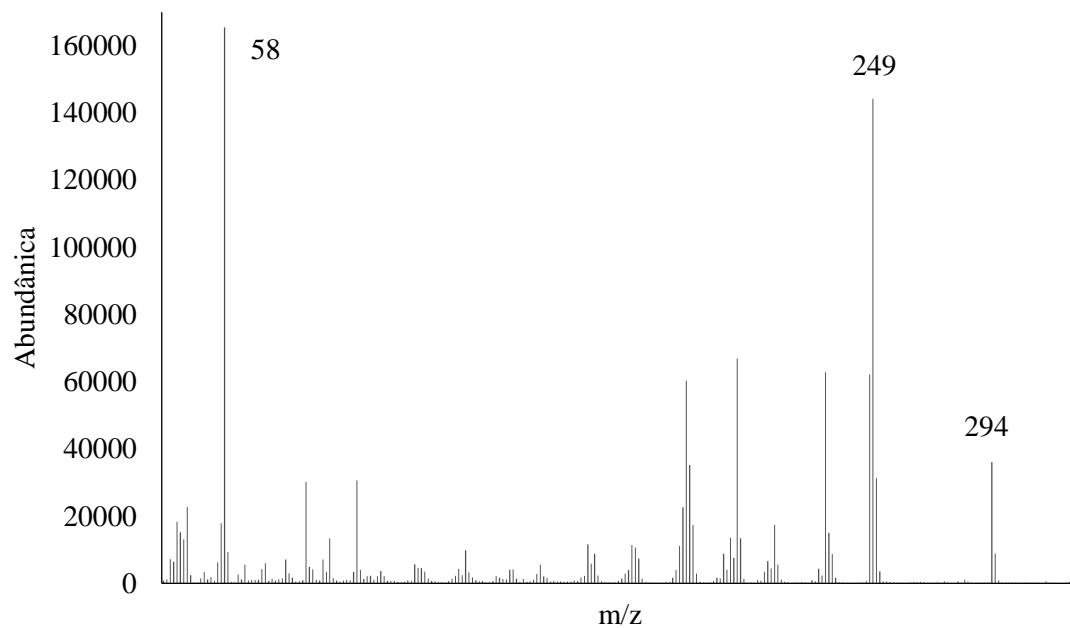


Figura III.3 - Espectro de massa característico da trimipramina.

d. Espectro de massa da imipramina

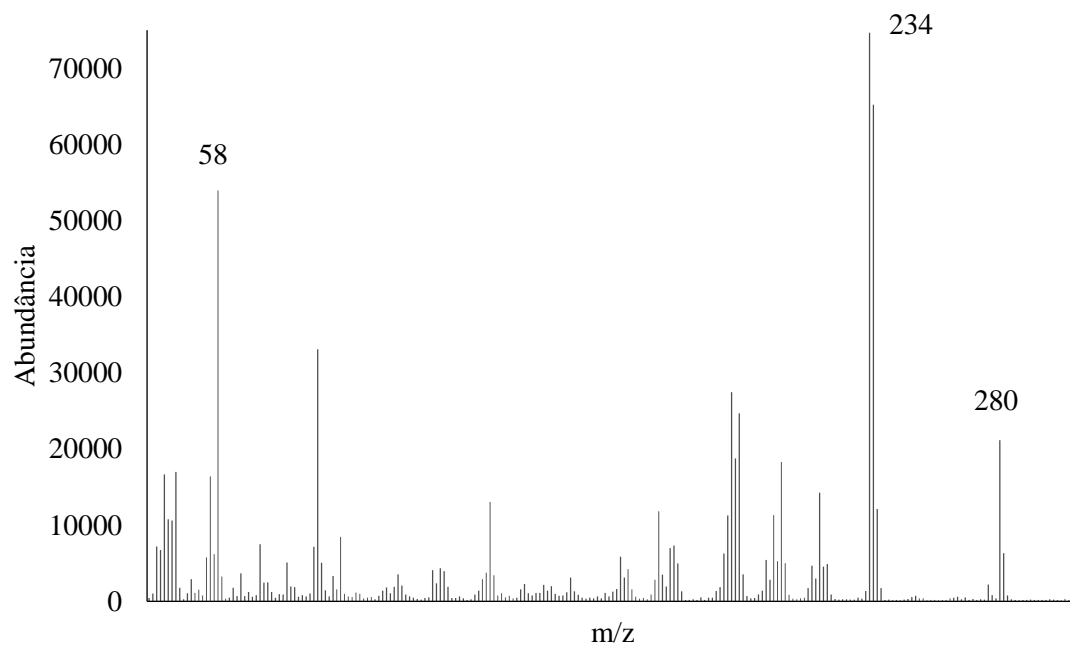


Figura III.4 - Espectro de massa característico da imipramina.

e. Espectro de massa da mirtizapina

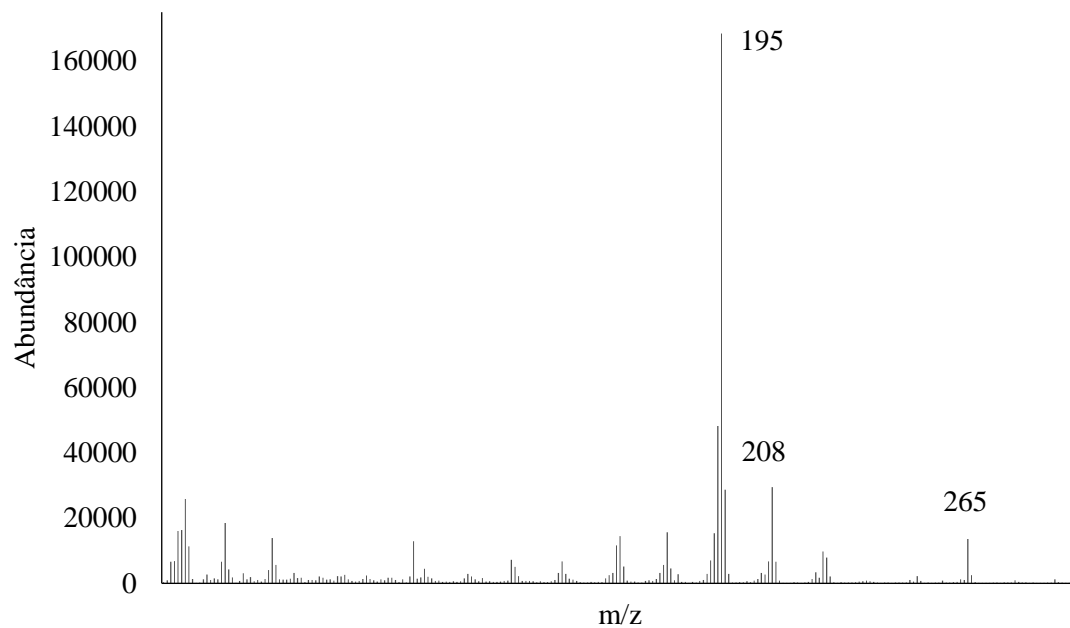


Figura III.5 - Espectro de massa característico da mirtazapina.

f. Espectro de massa da dosulepina

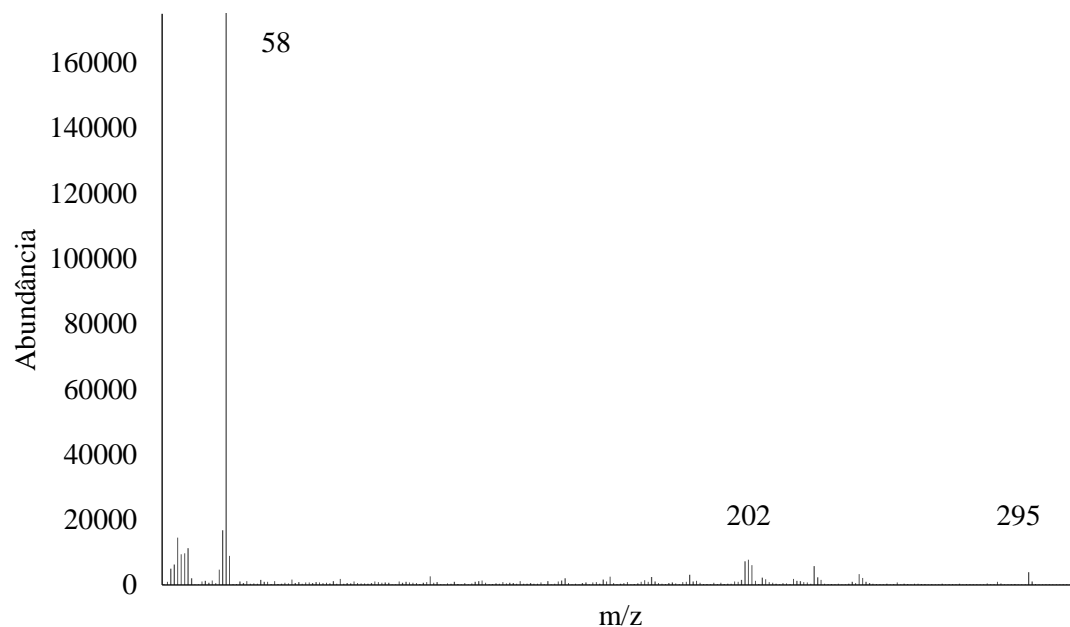


Figura III.6 - Espectro de massa característico da dosulepina.

IV. Anexo 4

i. Especiação dos compostos em função do pH obtidos pelo programa MarvinView

a. Cloridrato de amitriptilina

O pKa deste composto é 9,76, correspondente à transição entre a espécie 2 e a 1.

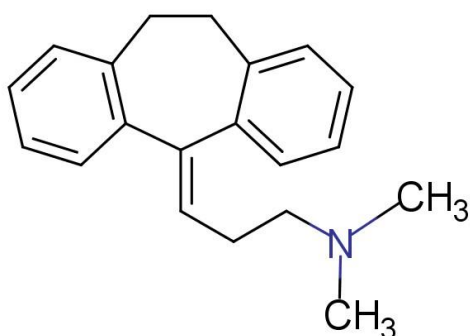


Figura IV.1 -Possível forma de ionização da AMI. Espécie 1.

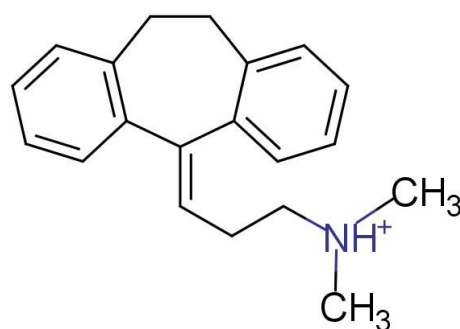


Figura IV.2 - Possível forma de ionização da AMI. Espécie 2.

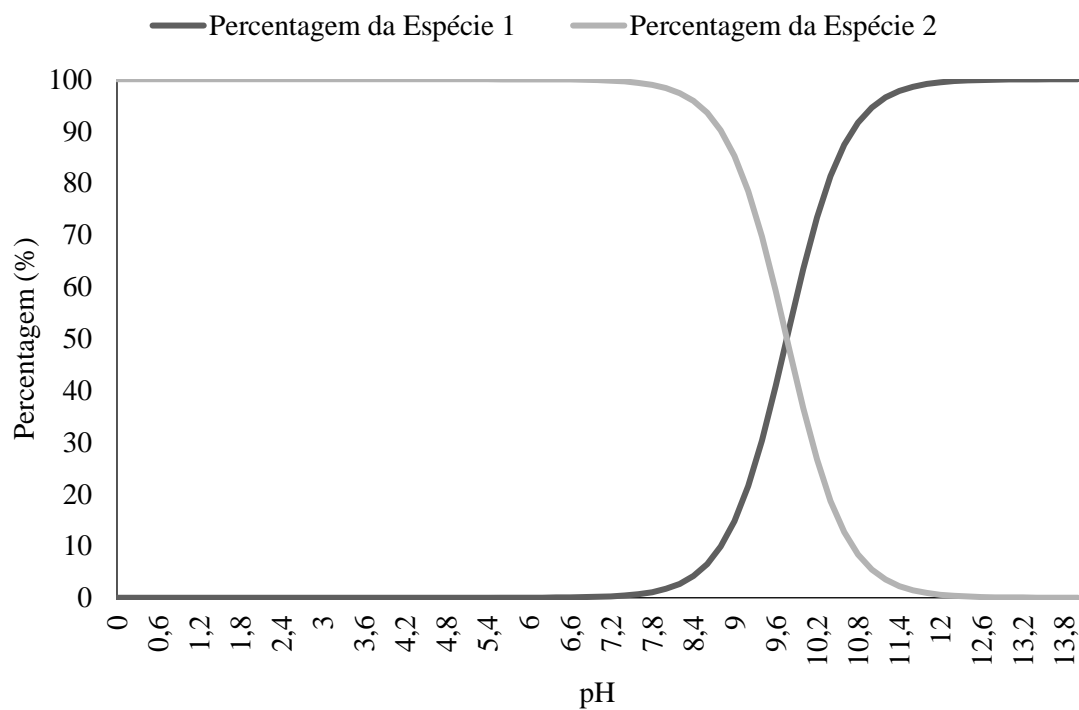


Figura IV.3 - Proporção das espécies neutras e ionizadas de AMI em função do pH.

b. Cloridrato de mianserina

O pKa deste composto é 6,92, correspondente à transição entre a espécie 2 e a 1. A espécie existe em muito pouca quantidade.

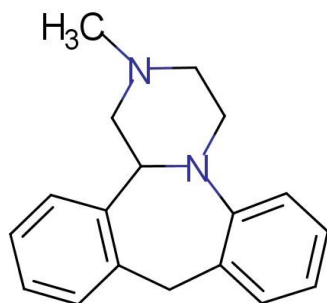


Figura IV.4 - Possível forma de ionização da MIA. Espécie 1.



Figura IV.5 - Possível forma de ionização da MIA. Espécie 2.

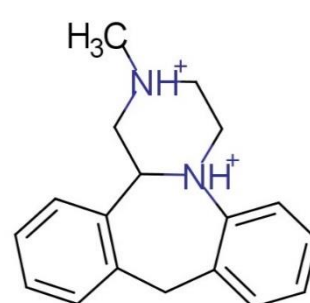


Figura IV.6 - Possível forma de ionização da MIA. Espécie 3.

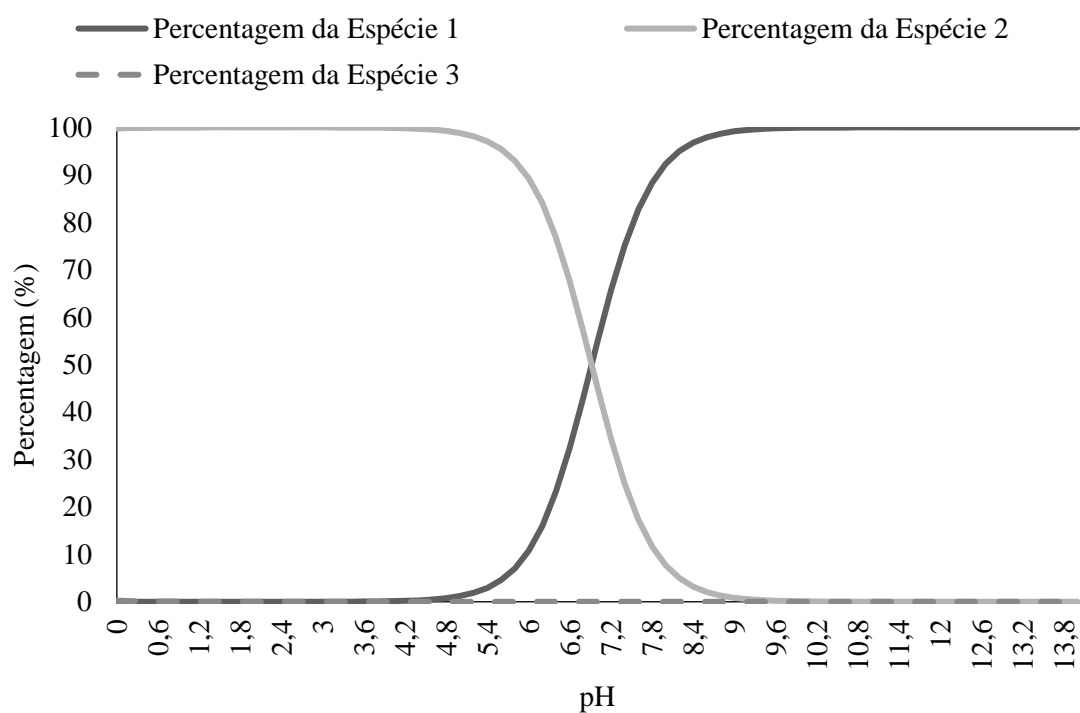


Figura IV.7 - Proporção das espécies neutras e ionizadas de MIA em função do pH.

c. Trimipramina

O pKa deste composto é 0,29 e 10,15, correspondente à transição entre a espécie 3 e a 2, e entre a espécie 2 e a 1, respectivamente.

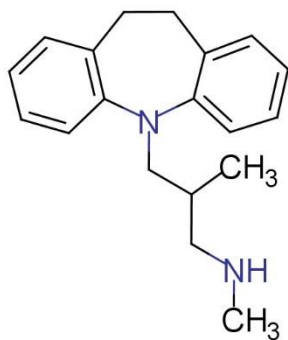


Figura IV.8 - Possível forma de ionização da TRI. Espécie 1.

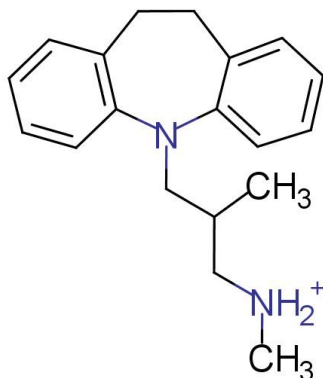


Figura IV.9 - Possível forma de ionização da TRI. Espécie 2.

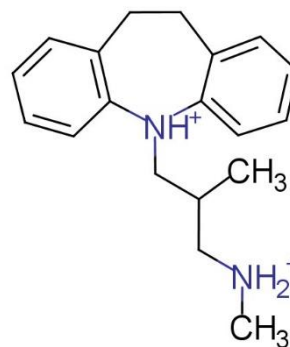


Figura IV.10 - Possível forma de ionização da TRI. Espécie 3.

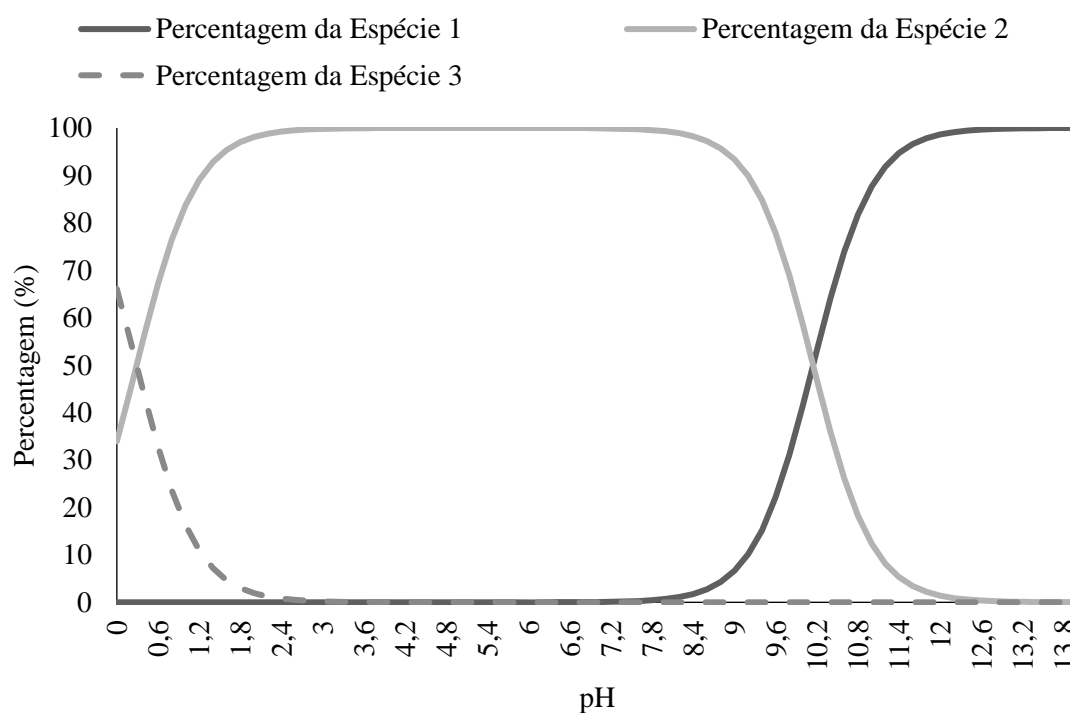


Figura IV.11 - Proporção das espécies neutras e ionizadas de TRI em função do pH.

d. Cloridrato de Imipramina

O pKa deste composto é 0,19 e 9,20, correspondente à transição entre a espécie 3 e a 2, e entre a espécie 2 e 1, respetivamente.

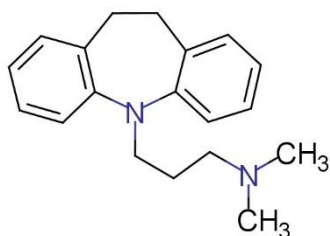


Figura IV.12 - Possível forma de ionização da IMP. Espécie 1

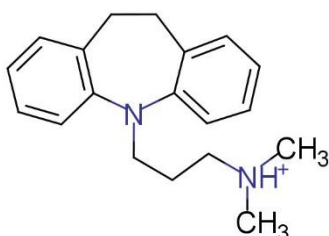


Figura IV.13 - Possível forma de ionização da IMP. Espécie 2

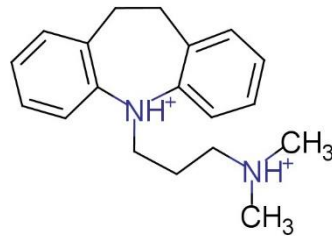


Figura IV.14 - Possível forma de ionização da IMP. Espécie 3

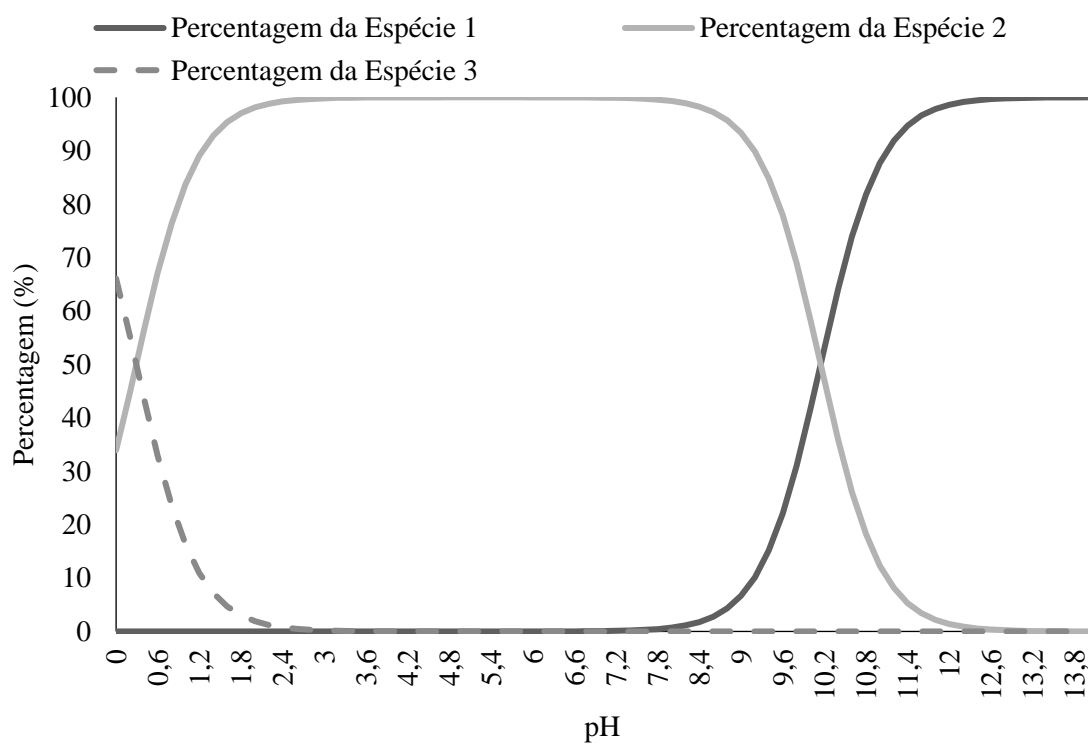


Figura IV.15 - Proporção das espécies neutras e ionizadas de IMP em função do pH.

e. Mirtazapina

O pKa deste composto é 5,36 e 6,67, correspondente à transição entre a espécie 4 e a 3, e entre a espécie 3 e a 1, respectivamente. A espécie 2 está presente apenas em baixa quantidade.

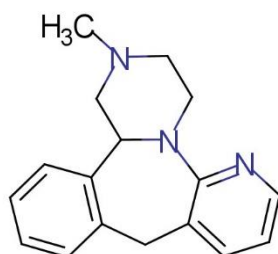


Figura IV.16 - Possível forma de ionização da MIR.
Espécie 1.

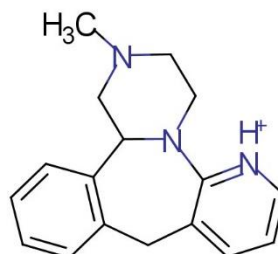


Figura IV.17 - Possível forma de ionização da MIR.
Espécie 2.

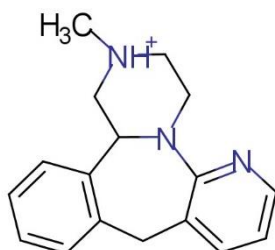


Figura IV.18 - Possível forma de ionização da MIR.
Espécie 3.



Figura IV.19 - Possível forma de ionização da MIR.
Espécie 4.

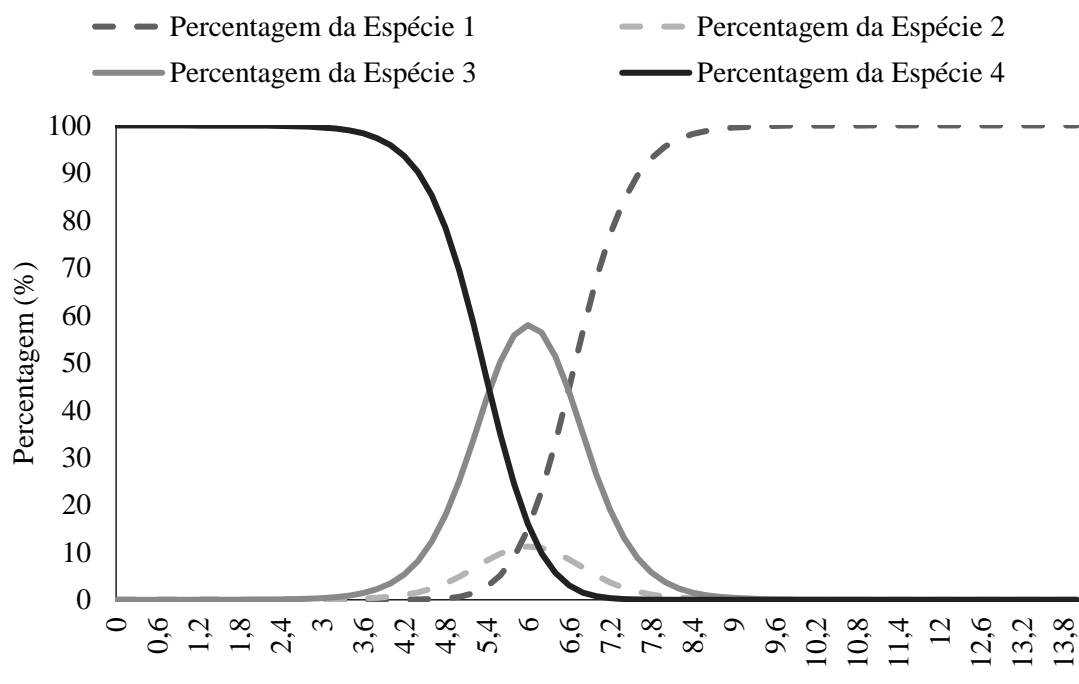


Figura IV.20 - Proporção das espécies neutras e ionizadas de MIR em função do pH

f. Cloridrato de Dosulepina

O pKa deste composto é 9,76, correspondente à transição entre a espécie 2 e a 1.

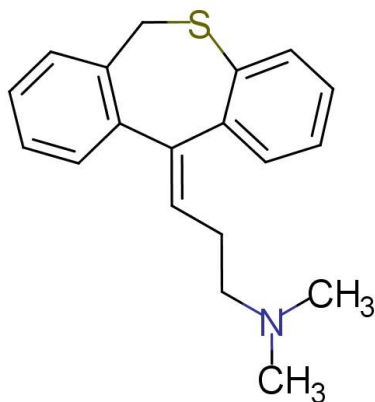


Figura IV.21 - Possível forma de ionização da DOT. Espécie 1.

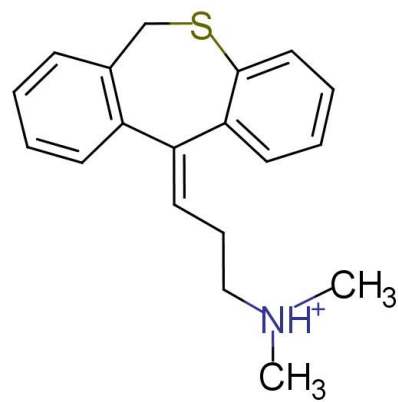


Figura IV.22 - Possível forma de ionização da DOT. Espécie 2.

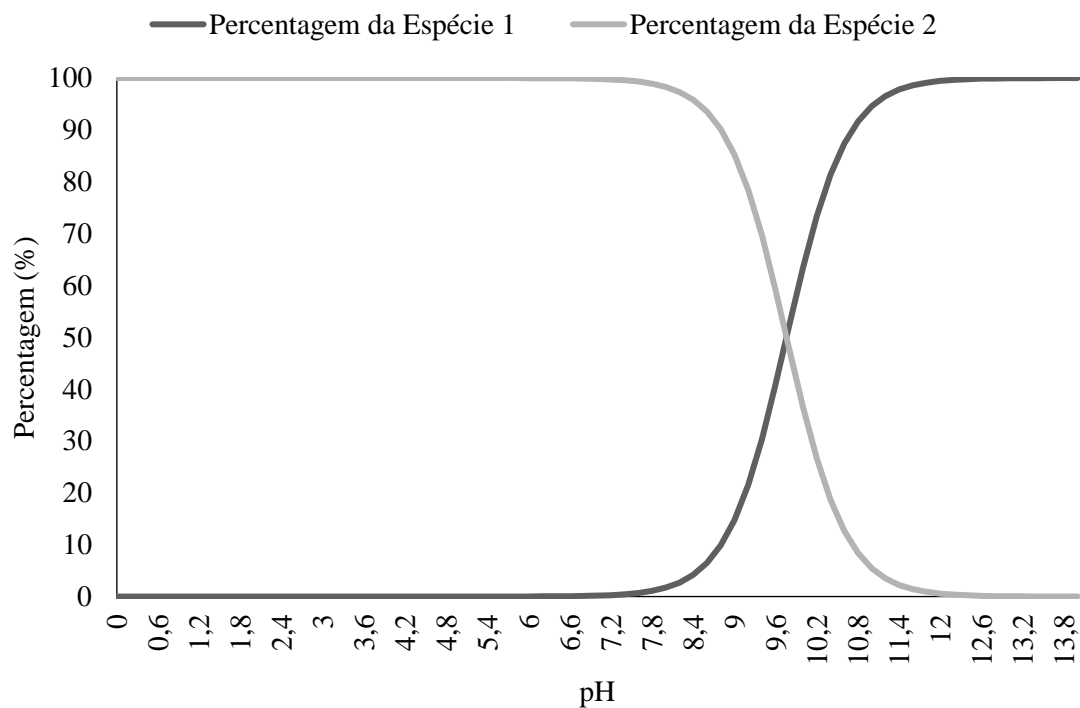


Figura IV.23 - Proporção das espécies neutras e ionizadas de DOT em função do pH.

V. Anexo 5

A conversão de uma regressão linear para uma regressão linear ponderada é realizada utilizando o fator de ponderação no cálculo dos parâmetros “a” e “b”, para equações do tipo $y=ax+b$, estes são calculados, respetivamente, pelas seguintes equações, V.1 e V.2 [81,83,86].

$$a_w = \frac{\sum_i w_i x_i y_i - n \bar{x}_w \bar{y}_w}{\sum_i w_i x_i^2 - n \bar{x}_w^2} \quad \text{V.1}$$

Onde w é o fator de ponderação, x é o valor da concentração utilizado, y é o sinal obtido, n é o número de réplicas, \bar{x}_w é o valor de x após aplicação do fator de ponderação, \bar{y}_w é o valor de y após aplicação do fator de ponderação [81,83,86].

$$b_w = \bar{y}_w - a_w \bar{x}_w \quad \text{V.2}$$

Onde \bar{x}_w e \bar{y}_w representam as coordenadas por onde a reta de calibração tem de passar, e estas são dadas, respetivamente, pelas equações V.3 e V.4 [81,86].

$$\bar{x}_w = \frac{\sum_i w_i x_i}{n} \quad \text{V.3}$$

$$\bar{y}_w = \frac{\sum_i w_i y_i}{n} \quad \text{V.4}$$

O coeficiente de correlação é dado pela equação V.5 [86] .

$$r_w = \frac{s_{xyw}}{\sqrt{s_{xxw}s_{yyw}}} = \frac{\sum w_i (x_i - \bar{x})(y_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum w_i (x_i - \bar{x})^2 \sum w_i (y_i - \bar{y})^2}} \quad \text{V.5}$$

A eficácia da regressão linear ponderada pode ser avaliada, tal como dito anteriormente, ao calcular a percentagem relativa do erro (%RE), que compara a concentração obtida, C_{exp} , pelas equações com a concentração teórica, C_{nom} , esta é dada pela equação V.6 [81,83].

$$\%RE = \frac{C_{exp} - C_{nom}}{C_{nom}} \times 100 \quad \text{V.6}$$

A soma das %RE é definida como a soma dos valores absolutos de %RE e é um indicador sensível da qualidade do ajuste. O melhor fator de ponderação apresenta a menor soma de %RE em toda a gama da concentração [81].

VI. Anexo 6

i. Curvas de calibração ponderadas em urina

a. Curva de calibração para a amitriptilina

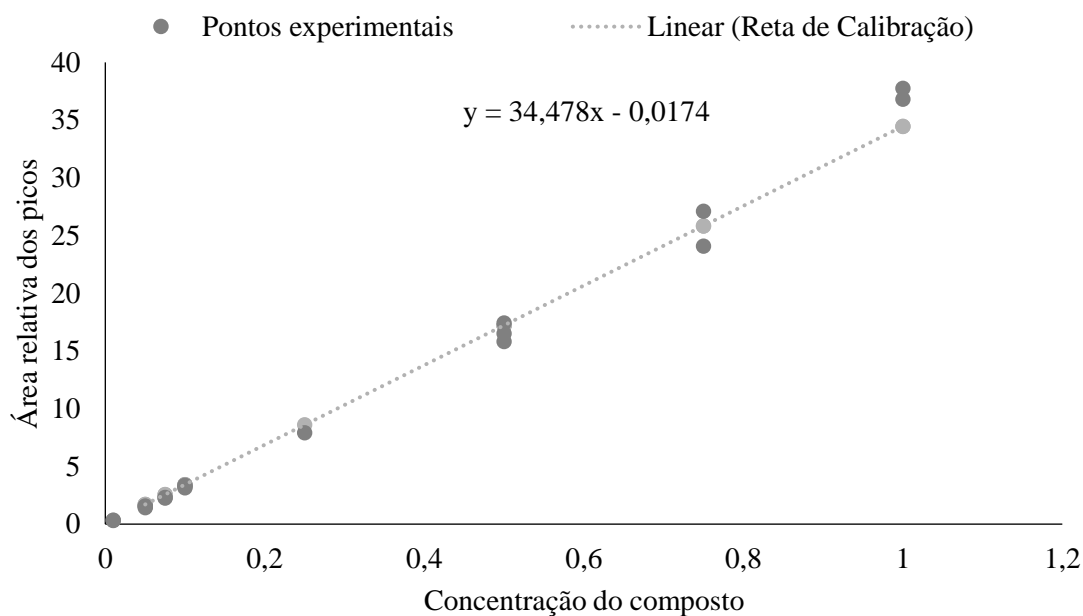


Figura VI.1 - Curva de calibração em urina para a AMT obtida pelo método de adição padrão.

b. Curva de calibração para a mianserina

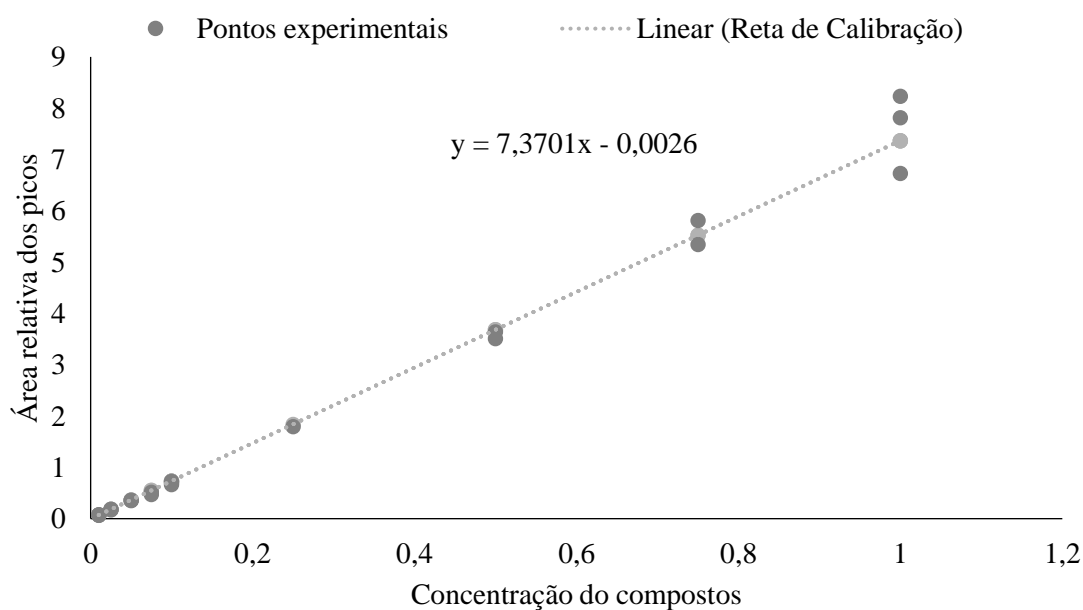


Figura VI.2 - Curva de calibração em urina para a MIA obtida pelo método de adição padrão.

c. Curva de calibração para a trimipramina

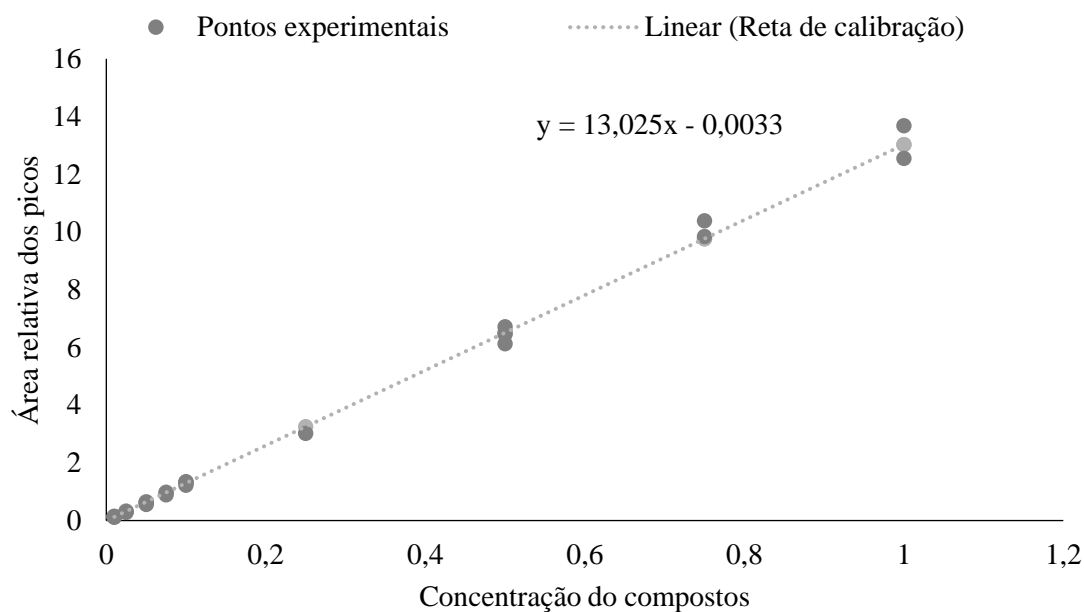


Figura VI.3 - Curva de calibração em urina para a TRI obtida pelo método de adição padrão.

d. Curva de calibração para a imipramina

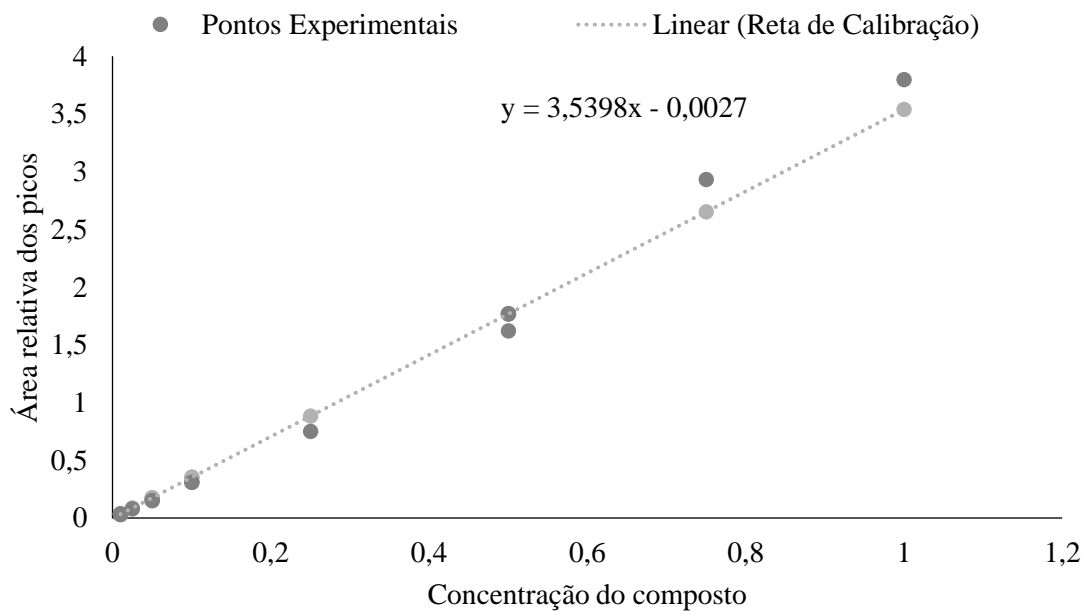


Figura VI.4 - Curva de calibração em urina para a IMP obtida pelo método de adição padrão.

e. Curva de calibração para a mirtizapina

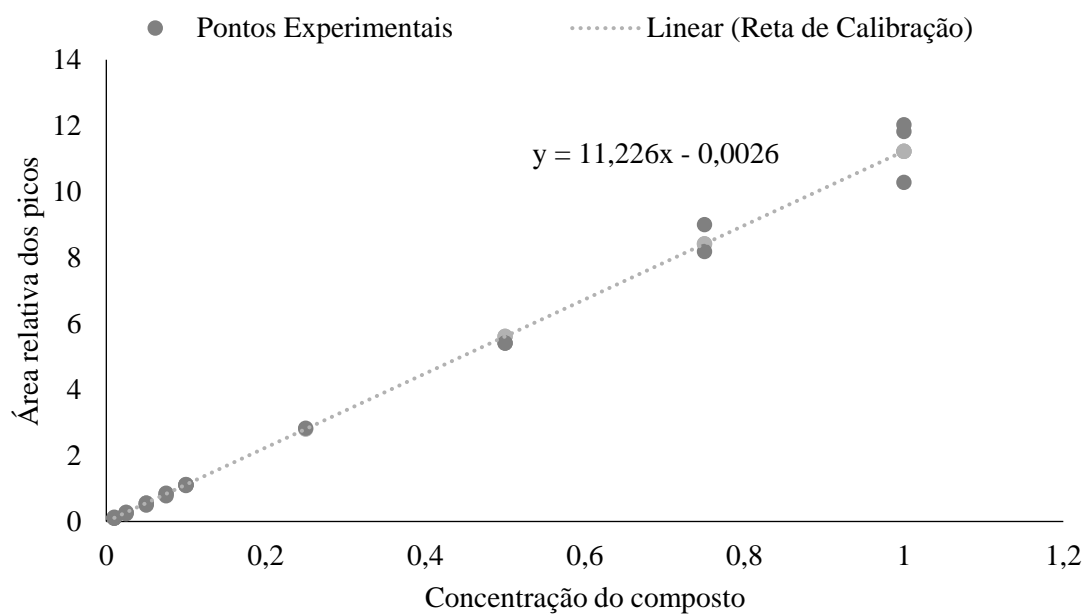


Figura VI.5 - Curva de calibração em urina para a MIR obtida pelo método de adição padrão.

f. Curva de calibração para a dosulepina

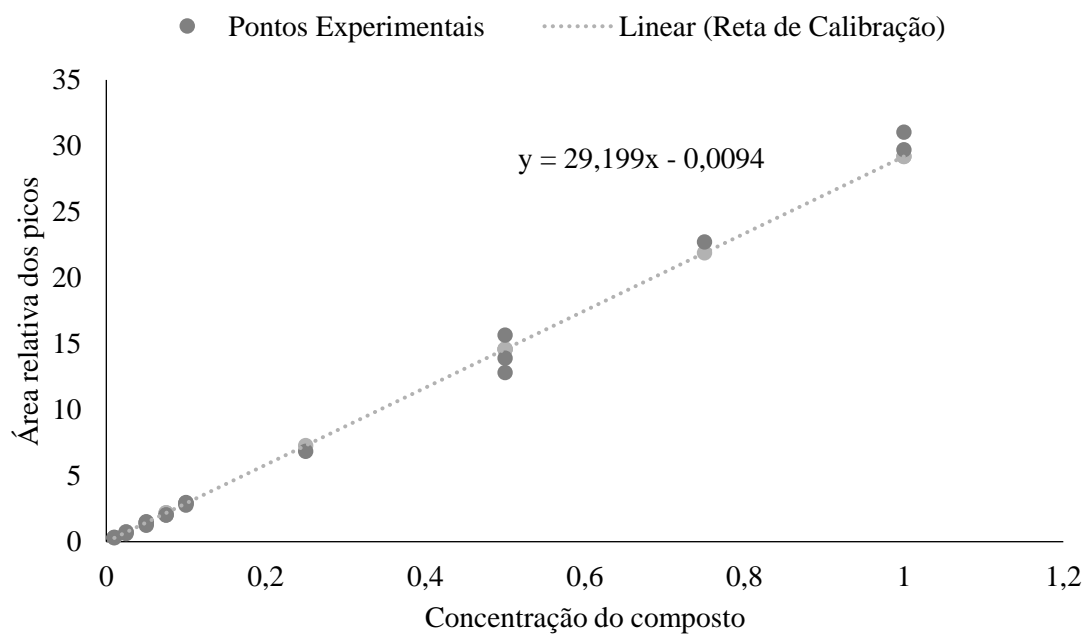


Figura VI.6 - Curva de calibração em urina para a DOT obtida pelo método de adição padrão.

VII. Anexo 7

Começou-se por calcular a incerteza de y (s_y), de acordo com a equação VII.1, tendo a reta de calibração a fórmula equivalente a $y=mx+b$.

$$s_y = \sqrt{\frac{\Sigma (d_i^2)}{n-2}} \quad \text{VII.1}$$

Onde n é o número de valores da curva de calibração e d_i^2 é dado pela equação VII.2.

$$d_i^2 = (y_i - \bar{y})^2 = (y_i - m \times x_i - b)^2 \quad \text{VII.2}$$

De seguida calculou-se a incerteza de x (s_x) de acordo com a equação VII.3. Onde k é o número de replicados.

$$s_x = \frac{s_y}{|m|} \sqrt{\frac{1}{k} + \frac{1}{n} + \frac{(y - \bar{y})^2}{m^2 \Sigma (x_i - \bar{x})^2}} \quad \text{VII.3}$$

Por forma a obter um valor de x com intervalo de confiança de 95%, deve-se utilizar a equação VII.4 usando um valor de t de *t-student* para o número de graus de liberdade adequado.

$$x \pm t \times s_x \quad \text{VII.4}$$

